

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

**Molekulare Mechanismen viral getriggelter Glomerulonephritis:
Aktivierung glomerulärer Endothelzellen über MyD88-
unabhängige zytosolische RNA- und DNA-Erkennung**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Holger Hägele

aus Augsburg

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Franz-Xaver Beck
Priv.-Doz. Dr. Michael Staehler
Priv.-Doz. Dr. Holger Schmid
Prof. Dr. Karl-Klaus Conzelmann

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 24.01.2013

Die vorliegende Arbeit wurde von April 2008 bis September 2009 in der Abteilung für Klinische Biochemie in der Medizinischen Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

(Komm. Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke)

Die Arbeit wurde betreut von Herrn Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders.

Förderung des Projekts

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Promotionsstudiums „Systembiologische Medizin“ durch das Förderprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe) der Medizinischen Fakultät der LMU München unterstützt.

Aus dieser Arbeit gingen folgende Originalarbeiten hervor:

Hägele H, Allam R, Pawar RD, Reichel CA, Krombach F, Anders HJ. Double-stranded DNA activates glomerular endothelial cells and enhances albumin permeability via a toll-like receptor-independent cytosolic DNA recognition pathway. *Am J Pathol.* 2009 Nov;175(5):1896-904.

Hägele H, Allam R, Pawar RD, Anders HJ. Double-stranded RNA activates type I interferon secretion in glomerular endothelial cells via retinoic acid-inducible gene (RIG)-1. *Nephrol Dial Transplant.* 2009 Nov;24(11):3312-8.

Für meine Eltern Behnan Hägele und
Rudolf Hägele (* 19.10.1946; † 08.11.2005)
in Dankbarkeit und Bewunderung

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	2
1.1	Chronische Niereninsuffizienz: Definition und Epidemiologie	2
1.2	Glomerulonephritis	5
1.3	Virusassoziierte Glomerulonephritis	9
1.3.1	Virale Nephropathien	10
1.3.2	Extrarenale virale Infektionen	11
1.4	Glomeruläre Filtrationsbarriere und glomeruläres Endothel	12
1.5	Das Immunsystem	15
1.5.1	Das angeborene (unspezifische) Immunsystem	15
1.5.2	Das erworbene (adaptive) Immunsystem	17
1.6	Immunabwehr viraler Nukleinsäuren	18
1.6.1	Toll-like Rezeptoren (TLR)	18
1.6.2	RIG-like Rezeptoren (RIG-like Helikasen)	22
1.6.3	Zytosolische DNA-Sensoren	23
1.6.4	Nod-like Rezeptoren und das Inflammasom	23
1.6.5	Zytokinausschüttung nach Erkennung viraler Nukleinsäuren	24
1.6.6	Signalwege der Nukleinsäure-vermittelten Zytokin- und Interferonsynthese	27
1.7	Glomeruläres Endothel in der Entzündungsreaktion	28
1.8	Zielsetzung und Hypothese	30
2	Material und Methoden	33
2.1	Material	33
2.1.1	Geräte, Chemikalien und Lösungen	33
2.1.2	Sequenzen der Oligonukleotid-Primer für die real-time RT-PCR	39
2.1.3	Sequenzen der short interfering RNA	40
2.1.4	Murine glomeruläre Endothelzellen (GEnC)	41
2.2	Methoden	42
2.2.1	Zellkultur und Stimulationsexperimente	42
2.2.2	Konfokalmikroskopie	45
2.2.3	ELISA	46
2.2.4	RNA-Analyse	46
2.2.5	Western Blot	50
2.2.6	Zellproliferation	51

2.2.7	Durchflusszytometrie	51
2.2.8	Intravitalmikroskopische Endothelstudien am M. cremaster <i>in vivo</i>	53
2.2.9	Statistische Auswertung	55
3	Ergebnisse	57
3.1	Pathogenerkennungsrezeptoren glomerulärer Endothelzellen	57
3.2	Induktion proinflammatorischer Zytokine, Chemokine und Typ-I-Interferons in glomerulären Endothelzellen durch poly I:C-RNA sowie B-DNA	60
3.3	Transmembran-Transport von poly I:C-RNA und B-DNA	64
3.3.1	Konfokalmikroskopie intrazellulär aufgenommener Nukleinsäuren	64
3.3.2	Clathrin-abhängige Endozytose	65
3.4	Intrazellulärer Signalweg	67
3.4.1	Erkennung von RNA und DNA unabhängig von MyD88	67
3.4.2	Funktioneller Gen-Knockdown der zytosolischen Rezeptoren der RNA- und DNA-Erkennung mittels short interfering RNA	69
3.5	Typ-I-Interferon-vermittelte antivirale Effekte auf glomeruläre Endothelzellen	73
3.5.1	Zytokinproduktion nach exogener Interferon- β -Exposition	73
3.5.2	Keine autokrine oder parakrine Stimulation der glomerulären Endothelzellen durch endogen produziertes Typ-I-Interferon	75
3.6	Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 in glomerulären Endothelzellen nach Nukleinsäure-Exposition <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	77
3.7	Albuminübertritt durch glomeruläre Endothelzellen <i>in vitro</i> und transendotheliale Permeabilität <i>in vivo</i> nach Nukleinsäure-Exposition	80
3.8	Auswirkungen der Nukleinsäure-Exposition auf Proliferation und Apoptose	83
4	Diskussion	87
4.1	Effekte der Nukleinsäuren auf glomeruläre Endothelzellen	89
4.2	Effekte ausgeschütteten Typ-I-Interferons auf Glomeruläre Endothelzellen	91
4.3	Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen und Leukozytenmigration	93
4.4	Albuminpermeabilität und Zellproliferation	94
4.5	Schlussfolgerung und Ausblick	96
5	Zusammenfassung	99
6	Literaturangaben	103
7	Abkürzungsverzeichnis	115
8	Lebenslauf	121
	Danksagung	123

Einleitung

1 Einleitung

1.1 Chronische Niereninsuffizienz: Definition und Epidemiologie

Chronische Niereninsuffizienz bezeichnet den langsamen, über Wochen oder Jahre hinweg fortschreitenden Verlust der Nierenfunktion. Meist bedingt durch eine chronische Nierenerkrankung führt dieser bis hin zum terminalen Nierenversagen, welches eine Nierenersatztherapie wie die Dialysebehandlung oder eine Nierentransplantation erfordert. Die Stadieneinteilung der chronischen Niereninsuffizienz erfolgt entsprechend dem Verlust der glomerulären Filtrationsrate (GFR), siehe Tabelle 1 [111].

Tabelle 1: Stadien der chronischen Niereninsuffizienz [111].

Stadium	GFR (ml/min/1,73m ²)	Diagnostik/Therapie	Prävalenz
1. Nierenschädigung bei normaler Nierenfunktion	> 90	Diagnostik der Nieren- und Begleiterkrankungen, Verminderung des kardiovaskulären Risikos	3,3 %
2. Milde Niereninsuffizienz	60 – 90		3,0 %
3. Mittelschwere Niereninsuffizienz	30 – 60	Therapie der Komplikationen	4,3 %
4. Schwere Niereninsuffizienz	15 – 30	Vorbereitung der Nierenersatztherapie	0,2 %
5. Nierenversagen	< 15	Nierenersatztherapie	0,1 %

In den vergangenen Jahren hat die Prävalenz des chronischen Nierenversagens stetig zugenommen, dementsprechend betrug die Zahl der Dialysepatienten in Deutschland Ende 2006 etwa 65.000, wie der neueste vorliegende Jahresbericht (2006) zur Qualitätssicherung in der Nierenersatztherapie (QuaSi-Niere) zeigt (Abbildung 1) [39]. Es ist nachzuvollziehen, dass dieser Umstand eine gewaltige soziale und ökonomische Herausforderung schafft. Niereninsuffiziente Patienten leiden nicht nur unter verminderter Lebensqualität und psychosozialer Belastung, sondern weisen oft auch Komorbiditäten auf, insbesondere für kardiovaskuläre und infektiöse Erkrankungen, sodass eine häufig lange Krankengeschichte mit drastisch herabgesetzter Lebenserwartung für Dialysepatienten resultiert [159].

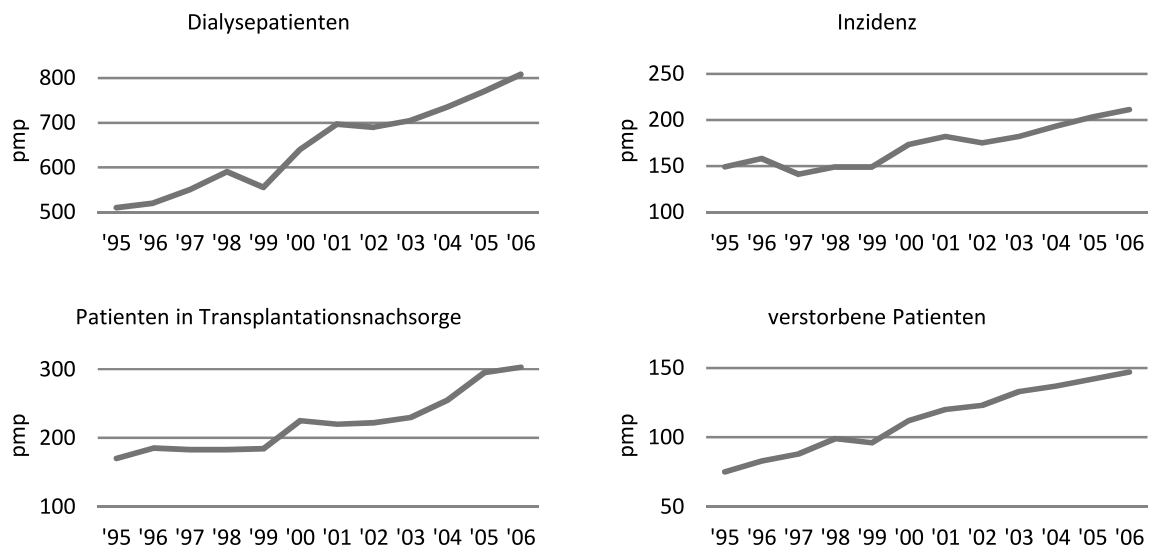


Abbildung 1: Jahresvergleich chronische Nierenersatztherapie 1995-2006 pro Million Einwohner (pmp; Abb. modifiziert aus [39]).

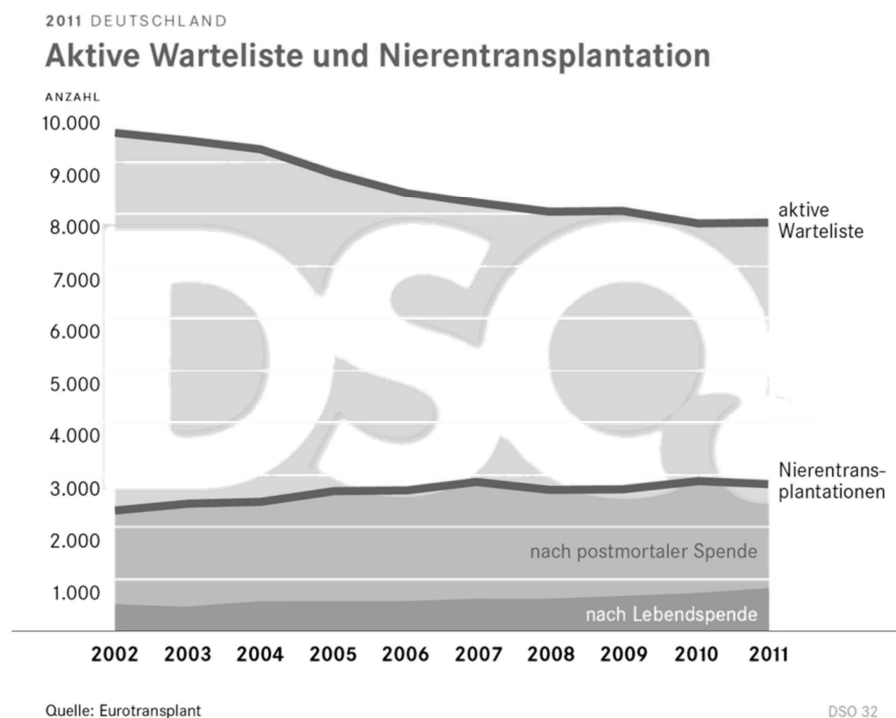


Abbildung 2: Anzahl von Patienten auf der aktiven Warteliste und Anzahl der Nierentransplantationen zwischen 2002 und 2011 [29]: Deutliche Diskrepanz zwischen der Anzahl der Patienten auf der Warteliste und der Zahl der Nierentransplantationen.

Neben der Krankheitsbelastung für den Patienten haben medizinische Interventionen, die durch Begleiterkrankungen erforderlich werden, aber auch die Nierenersatztherapie, erhebliche Kosten für das Gesundheitssystem zur Folge. Leidensdruck und finanzielle Ausgaben könnten mit einer größeren Zahl an Nierentransplantationen gesenkt werden, jedoch beträgt die Wartezeit auf ein Transplantat etwa vier bis sechs Jahre [39]. Es erstaunt daher nicht, dass sich in Deutschland etwa dreimal so viele Patienten auf der Warteliste befinden wie Nierentransplantationen durchgeführt werden (Abbildung 2) [29].

Die Ursachen für chronisches Nierenversagen sind vielfältiger Natur. Die in Deutschland am häufigsten gestellte Diagnose bei Dialysepatienten im Jahr 2006 war die Diabetische Nephropathie, die bei 28 % der Patienten eine Nierenersatztherapie erforderlich machte. Die zweite große Gruppe bilden mit 19 % Glomerulonephritiden; vaskuläre Nephropathien und interstitielle Nephritiden folgen mit 17 % bzw. 12 % (Abbildung 3) [39]. Von enormer Wichtigkeit ist daher die entscheidende Verbesserung von Diagnostik, Prophylaxe und Therapie dieser Nierenerkrankungen.

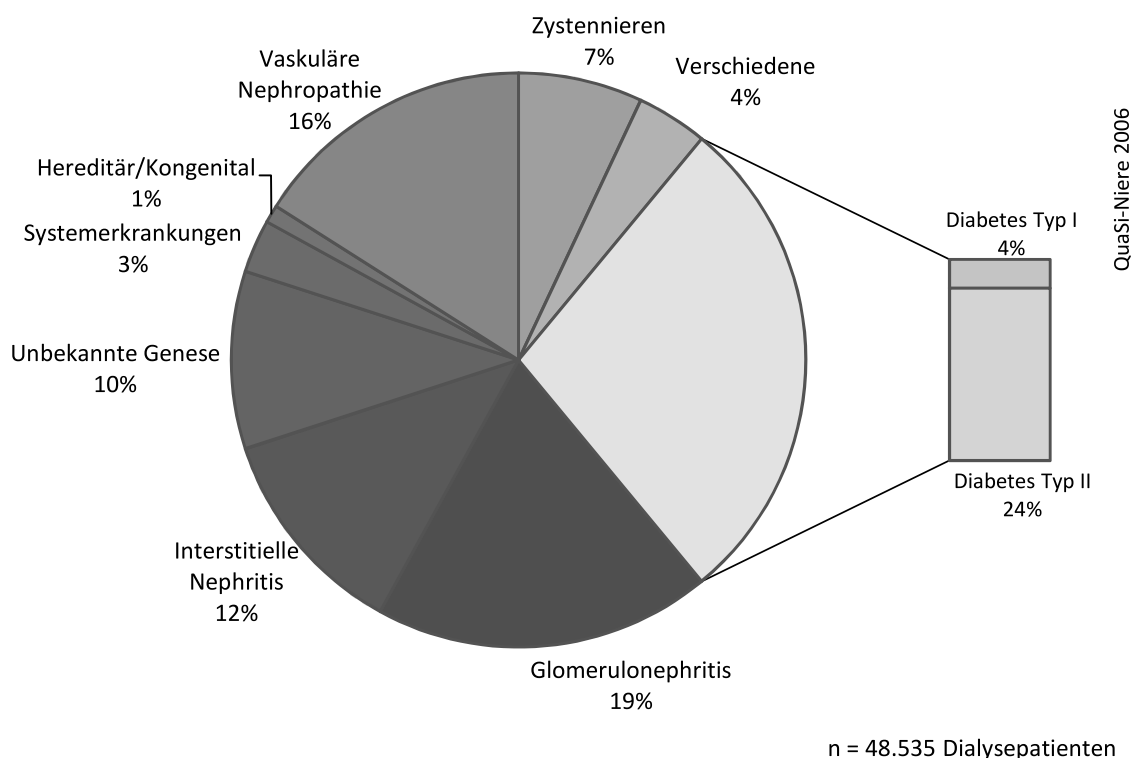


Abbildung 3: Diagnoseverteilung aller rund 49.000 bei QuaSi-Niere erfassten lebenden Dialysepatienten in Nierenersatztherapie (Prävalenz) 2006 (Abb. modifiziert aus [124]).

1.2 Glomerulonephritis

Wie Abbildung 3 zeigt, machen Glomerulonephritiden (GN) einen großen Teil der Diagnosen aus, die bei Dialysepatienten gestellt werden. Hierunter versteht man immunvermittelte Erkrankungen, die mit einer Entzündungsreaktion der Glomeruli in der Niere einhergehen. Primäre Glomerulonephritiden spielen sich an den Glomeruli ab, ohne dass Zeichen einer Systemerkrankung vorliegen, während sich sekundäre Glomerulonephritiden im Rahmen von Systemerkrankungen manifestieren, beispielsweise bei Kollagenosen und Vaskulitiden, oder extrarenalen Infektionen [101]. Oft ist die Ätiologie der Glomerulonephritis nicht zu bestimmen, meist sind humorale Immunreaktionen in Form von Antikörpern gegen bakterielle, virale, nukleäre oder tumorassoziierte Antigene beteiligt. Diese Immunmechanismen haben bei der Pathogenese eine wichtige Rolle, indem sie entweder über Immunkomplexe, Antikörper gegen die glomeruläre Basalmembran oder zellvermittelt zu einer glomerulären Schädigung führen [22, 163].

Ablagerungen von peripher gebildeten Antigen-Antikörper-Immunkomplexen in den Kapillarschlingen der Glomeruli induzieren dort subepithelial oder subendothelial eine Entzündungsreaktion. Langfristig proliferieren hierbei Mesangial- und Endothelzellen, die glomeruläre Basalmembran verdickt. Eine solche Pathogenese beobachtet man bei der Lupusnephritis und bei der postinfektiösen Glomerulonephritis. Bei der Antikörper-vermittelten Glomerulonephritis finden sich gegen die glomeruläre Basalmembran gerichtete Antikörper. Bekanntes Beispiel für solch eine Glomerulonephritis ist das Goodpasture-Syndrom. Zudem kann eine Glomerulonephritis auch zellvermittelt ablaufen, indem T-Zellen, Makrophagen und Granulozyten gemeinsam eine entzündlich bedingte Abnahme der glomerulären Filtrationsrate bewirken [15].

Klinisch äußern sich Glomerulonephritiden in der Regel in Makrohämaturie, Hypertonie, Proteinurie, Ödemen und Hyperlipidämie. Gerade im chronischen Verlauf können die Symptome des nephrotischen Syndroms stärker imponieren, wobei die Entzündungsreaktion oft erst spät erkannt wird, was einen entsprechend fortgeschrittenen Krankheitsverlauf mit sich bringt [21].

Histopathologisch können Glomerulonephritiden unterschiedlich eingeteilt werden, wobei eine Unterscheidung zwischen primärer oder sekundärer GN nur unter Einbeziehung von klinischen Befunden und serologischen Markern getroffen werden kann. Im Folgenden wird näher auf einzelne Formen eingegangen, welche besonders bei virusassoziierten Glomerulonephritiden zu beobachten sind.

Diffuse extrakapilläre Glomerulonephritis (rapid progressive GN)

Diese sehr rasch progrediente extrakapilläre Glomerulonephritis kann unbehandelt innerhalb von Wochen zu einem chronischen Nierenversagen führen und erfordert somit dringendes Einschreiten seitens des Arztes. Zugrunde liegen ihr unterschiedliche Ursachen, die zur Nekrose der Kapillarschlingen und einer extrakapillären Proliferation der Bowman-Kapsel führen (extrakapilläre Halbmondbildung). Häufig ist die diffuse extrakapilläre Glomerulonephritis mit dem Goodpasture-Syndrom, ANCA-assoziierten Vaskulitiden und anderen Immunkomplex-Glomerulonephritiden assoziiert. Dabei zeigt sich, dass die ätiologischen und pathogenetischen Vorgänge durchaus nicht einheitlich sein müssen, führen jedoch gemeinsam zu einem rasch progressiven nephritischen Syndrom [15, 22].

Diffuse endokapilläre Glomerulonephritis (postinfektiöse GN)

Diese Glomerulonephritis ist häufig mit einer postinfektiösen Ätiologie verbunden. Typisch sind Infektionen mit β -hämolisierende Streptokokken, welche in den letzten Jahrzehnten in der westlichen Welt jedoch rar geworden sind, sodass inzwischen andere Erreger in den Vordergrund geraten. Bei der postinfektiösen Glomerulonephritis lagern sich zirkulierende Immunkomplexe an der Basalmembran in Form sog. *humps* (engl. Höcker) ab und führen zur Aktivierung des Komplementsystems und Entzündungsreaktion. Ein inflammatorisches Milieu mit chemotaktischen Faktoren bewirkt die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und die Proliferation von Endothel- und Mesangialzellen. Akut kommt es zur Hämaturie, Proteinurie, Ödembildung und Hypertonie, langfristig sind die Glomeruli durch entzündliche Umbauprozesse sklerotisch verändert, was bis zur Niereninsuffizienz fortschreiten kann [15].

Membranöse Glomerulonephritis

Die membranöse Glomerulonephritis ist durch Immunkomplexablagerungen gekennzeichnet, die sich epi-/perimembranös, subepithelial befinden. Selten tritt diese Form der Glomerulonephritis primär auf, häufiger sekundär als Folge von infektiösen Erkrankungen, Medikamenten, Tumoren oder Lupus erythematodes. Die Immunkomplexablagerungen

bewirken *spike*-artige Basalmembranverbreiterungen um die Immunkomplexe herum. Charakteristisch ist ein nephrotisches Syndrom oder eine alleinige Proteinurie. Assoziiert ist die membranöse GN mit Hepatitis-B- oder -C-Infektionen [64, 155], siehe auch Kapitel 1.3.2.

Mesangioproliferative Glomerulonephritis

Wie der Name vermuten lässt, kommt es bei der mesangioproliferativen Glomerulonephritis zu einer Proliferation der Zellen des Mesangiums. Diese rein deskriptive histopathologische Beobachtung tritt bei verschiedenen Grundkrankheiten auf, darunter am häufigsten ist die IgA-Nephritis, die auch insgesamt die häufigste Form einer Glomerulonephritis darstellt. IgA-Komplexe lagern sich im Mesangium ab und induzieren eine Proliferation desselben, woraus eine Verbreiterung der mesangialen Matrix und klinisch eine Proteinurie, gelegentlich mit Hämaturie, resultiert [15]. Hepatitis-B-Virus-Infektionen können mit dieser Glomerulonephritis vergesellschaftet sein [13].

Membranoproliferative Glomerulonephritis (MPGN)

Die diffuse membranoproliferative Glomerulonephritis ist durch mesangiale Proliferationen und eine Verbreiterung der Basalmembran gekennzeichnet. Bei der Typ-1-MPGN kommt es typischerweise zu subendothelialen Ablagerungen von Immunkomplexen, während sich bei der Typ-2-MPGN sog. *dense deposits* (im Elektronenmikroskop dicht erscheinende Ablagerungen) in den Kapillarschlingen befinden [15]. Die Immunkomplexe beim Typ 1 stehen im Zusammenhang mit Infektionserkrankungen, besonders Hepatitis B und C [104, 155]. Abbildung 4 zeigt das Bild einer ausgeprägten MPGN, zudem die Morphologie einer MPGN bei einem HCV-positiven Nierenpräparat.

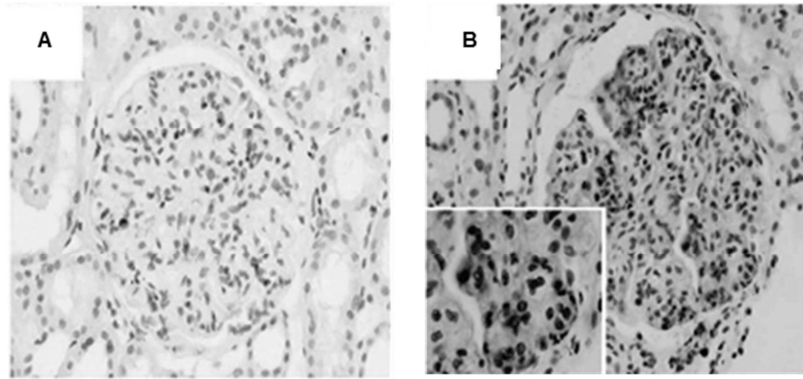


Abbildung 4: Histopathologische Schnitte aus Glomeruli, aus [18]. Links (A) ist ein Glomerulus eines Hepatitis-C-negativen Präparates mit dem Bild einer Membranoproliferativen Glomerulonephritis (MPGN) zu sehen. Man erkennt Verbreiterungen des Mesangiums. Rechts (B) abgebildet ist ein Glomerulus eines HCV-positiven Präparates mit ausgeprägter Morphologie einer MPGN. Immunhistochemisch wurde gegen das sog. HCV-NS3-Antigen gefärbt, das sich erkennbar an den glomerulären Kapillaren abgelagert. Vergrößerung 200-fach.

Fokal Segmentale Glomerulosklerose (FSGS)

Bei der Fokal Segmentalen Glomerulosklerose stehen segmentale Hyalinosen und Sklerosen im Vordergrund, außerdem eine Abflachung und Verschmelzung der Podozytenfußfortsätze. Die Ätiologie ist vielfältig, jedoch ist die FSGS sekundär oft mit der HIV-Infektion vergesellschaftet [70]. Grundlage der Pathogenese ist offenbar die Schädigung der Podozyten, welche eine Dysfunktion der glomerulären Filtrationsbarriere zur Folge hat und somit klinisch ein nephrotisches Syndrom erzeugt. Aufgrund der Steroidresistenz ist ein Fortschreiten bis hin zum chronischen Nierenversagen nicht selten [15].

Minimal-change Erkrankung (MCD)

Die Besonderheit der Minimal-change Erkrankung (auch Minimal-change disease, MCD) liegt darin, dass histopathologisch eine nahezu normale Morphologie vorliegt, klinisch jedoch ein ausgeprägtes nephrotisches Syndrom. Einzig die bei der fokal sklerosierenden Glomerulonephritis bestehenden Verschmelzungen der Podozytenfußfortsätze können bei der MCD beobachtet werden. Ätiologie und Pathogenese sind ansonsten nicht geklärt, man vermutet jedoch auch hier Podozytenerkrankungen, die zum Funktionsverlust der glomerulären Filtrationsbarriere führen. Die Prognose ist wegen einer höheren Steroidempfindlichkeit jedoch besser als bei der FSGS [15, 21].

1.3 Virusassoziierte Glomerulonephritis

Die oben beschriebenen Glomerulonephritiden haben vielfältige Ursachen, häufig spielen dabei virale Infektionen eine besondere Rolle. Nicht nur virale Nephropathien wie die HIV-Nephropathie führen zu pathologischen glomerulären Veränderungen, sondern auch extrarenale virale Infektionen. So weiß man, dass solche Virusinfektionen eine *de novo* Immunkomplex-Glomerulonephritis triggern können, wie dies beispielsweise bei der Hepatitis-C-assoziierten Glomerulonephritis der Fall ist [112]. Oft bewirken virale Infektionen eine verstärkte Progression einer bereits bestehenden Glomerulonephritis, so bei der IgA-Nephropathie, der Lupusnephritis oder der renalen Vaskulitis [22, 85], was vermutlich auf eine Immunstimulation im Rahmen der Virusinfektion zurückzuführen ist [107]. Die Pathomechanismen einer viral getriggerten Glomerulonephritis sind bislang noch ungeklärt, Tabelle 2 zeigt eine Übersicht über Viren und die mit ihnen jeweils assoziierten Nierenerkrankungen.

Tabelle 2: Virusinfektionen, die entzündliche Nierenerkrankungen auslösen können [9, 27, 164].

Virus	Nierenerkrankung
Hepatitis-C-Virus (HCV)	Membranoproliferative Glomerulonephritis (GN), IgA-Nephritis, Membranöse GN, Kryoglobulinämie
Hepatitis-B-Virus (HBV)	Membranöse Nephropathie, Membranoproliferative GN, Mesangio-proliferative GN
Humanes-Immunodefizienz-Virus (HIV)	HIV-Nephropathie, kollabierende Fokal segmentale Glomerulosklerose (FSGS)
Parvovirus B19	FSGS, Tubulointerstitielle Nephritis
Epstein-Barr-Virus (EBV)	Membranöse Nephropathie (?), Lupusnephritis (?)
Polyoma-Virus 1 (BK-Virus)	BK-Nephropathie (Allograft-Nephropathie)
Hanta-Virus	Hantaan-Nephropathie, akutes Nierenversagen
Cytomegalievirus (CMV)	Tubulointerstitielle Nephritis, Allograft-Nephropathie (?)

Die Virusinfektion scheint die glomeruläre Entzündungsreaktion nicht nur durch die Bildung von Immunkomplexen aus viralen Antigenen und Antikörpern einzuleiten [43, 78], sondern auch über die Aktivierung systemischer antiviraler Immunmechanismen, die zur Verschlechterung der Glomerulonephritis beitragen [85, 154]. Autoantikörper, Immunkomplexbildung und vor allem die systemische Ausschüttung von Typ-I-Interferon

spielen hierbei eine zentrale Rolle. Bezüglich der Wirkung von Typ-I-Interferon bei Nephritiden fand man heraus, dass Interferon α dendritische Zellen, Plasmazellen und T-Zellen aktiviert, was zu einer Verschlechterung einer Immunkomplex-Glomerulonephritis führt [33].

1.3.1 Virale Nephropathien

Als virale Nephropathien bezeichnet man Virusinfektionen, die direkt in der Niere stattfinden. Die HIV-Nephropathie ist eine bedeutende Viruserkrankung der Niere, die sich klinisch oft als nephrotisches Syndrom und rasch progrediente Niereninsuffizienz bis hin zum terminalen Nierenversagen äußert [90, 157, 165]. Histopathologisch wird sie als sog. kollabierende Variante der fokal sklerosierenden Glomerulosklerose beschrieben. Hierbei zeigen sich hypertrophierte und hyperplastische viszerale Epithelzellen und Podozyten, außerdem ein kollabiertes und sklerosiertes Kapillarknäuel [25, 70]. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen imponieren sog. tubuloretikuläre Einschlüsse in Podozyten [147] und glomerulären Endothelzellen und Kapillaren [172].

Die bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnisse zur HIV-Nephropathie beruhen hauptsächlich auf Biopsiematerial menschlicher Nieren [9]. Hier fand man heraus, dass in Nieren HIV-nephropathischer Patienten erhöhte Werte von Interferon α zu detektieren waren, verglichen mit HIV-negativen Nieren mit fokal segmentaler Glomerulosklerose [77]. Offenbar besitzt lokal ausgeschüttetes Interferon α eine Rolle bei der Ausbildung tubuloretikulärer Strukturen in HIV-infizierten Podozyten [147], die jenen tubuloretikulären Einschlüssen in Leukozyten ähneln, die man bei Patienten unter IFN- α -Therapie beobachtet [9]. Therapeutisch kann die HIV-Nephropathie durch eine intensive antiretrovirale Therapie in ihrer Progression verlangsamt werden [36, 70].

Andere virale Nephropathien können sich bei Infektionen mit dem Humanen Polyomavirus 1 (BK-Virus) oder Hanta-Virus entwickeln, welche in der Niere vermutlich eine lokale Synthese von Typ-I-Interferon bewirken [128]. Jedoch ist über die Pathomechanismen der HIV-, BK-Virus- oder Hanta-Virus-Nephropathie wenig bekannt [9].

1.3.2 Extrarenale virale Infektionen

Sogar wenn sich virale Infektionen primär nicht in der Niere abspielen, haben sie einen Einfluss auf entzündliches Geschehen innerhalb der Niere und speziell an den Glomeruli. Häufige extrarenale Triggerinfektionen für entzündliche glomeruläre Prozesse sind Infektionen mit Hepatitis B und C.

Bei der Hepatitis-C-Virus-assoziierten Nephropathie ist meist eine membranoproliferative Glomerulonephritis (MPGN) vom Typ I [106], seltener auch eine membranöse Glomerulonephritis zu beobachten, die klinisch mit Mikrohämaturie und Proteinurie einhergeht [64]. Bei derzeit knapp 200 Millionen Infizierten weltweit und ca. 400.000 bis 500.000 in Deutschland gewinnen die Hepatitis-C-Infektion, besonders aufgrund ihrer Chronifizierung, und die Hepatitis-C-assoziierte Glomerulonephritis an großer Bedeutung [129]. In einer Studie von Tarantino et. al erlitten 15 % der Patienten mit HCV-assoziierten Nephropathien ein chronisches Nierenversagen [153]. Hinzu kommt, dass die HCV-assoziierte membranoproliferative Glomerulonephritis bei 30 bis 90 % der Patienten mit der gemischten Kryoglobulinämie im Zusammenhang steht [76]. Wie in Kapitel 1.2 erwähnt, kommt es bei der membranoproliferativen Glomerulonephritis zu subendothelialen Immunkomplexablagerungen, so ist dies wahrscheinlich auch bei der HCV-assoziierten Glomerulonephritis der Fall [64].

Der ursächliche Einfluss der HCV-Nukleinsäuren scheint sich darin zu bestätigen, dass eine Interferontherapie und Viruslastsenkung eine Besserung der klinischen Symptomatik der HCV-assoziierten Glomerulonephritis bewirkt [104]. Es könnte auch hier eine lokale antivirale Immunantwort in Form einer IFN- α -Sekretion zur Pathogenese beitragen.

Die Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus ist eine der häufigsten Infektionskrankheiten weltweit. Nach Angaben der WHO haben weltweit etwa 2 Milliarden Menschen Kontakt mit dem Virus gehabt und eine Infektion durchgemacht, ca. 350 Millionen sind chronisch infiziert, wobei die geographische Verteilung weltweit sehr unterschiedlich ist [168]. In Deutschland sind die Zahlen gemeldeter HBV-Infektionen seit Einführung der wirksamen Impfung zuletzt zwar gering rückläufig, jedoch beträgt die Seroprävalenz für HBsAg (Indikator für eine aktuelle Infektion) beträchtliche 0,6 % [130]. Mit der regional unterschiedlichen Verbreitung der HBV-Prävalenz korreliert auch das Auftreten einer HBV-assoziierten entzündlichen Nierenerkrankung [91]. Infektionen mit dem Hepatitis-B-Virus

können renal mit meist membranöser Glomerulonephritis assoziiert sein, gelegentlich auch mit membranoproliferativer oder mesangioproliferativer Glomerulonephritis [9]. Klinisch macht sich die renale Beteiligung einer Hepatitis-B-Infektion mit Proteinurie und Mikrohämaturie bei evtl. eingeschränkter Nierenfunktion bemerkbar [155], die sich bei einem Viertel der Betroffenen bis zum terminalen Nierenversagen entwickeln kann [13]. Im histopathologischen Befund konnten bei der HBV-assoziierten Glomerulonephritis subepitheliale Ablagerungen von Hepatitis-B-Antigenen (HBsAg, HBcAg, HBeAg) und Antikörpern in subepithelialen Immunkomplexen entlang den Kapillarwänden des glomerulären Endothels nachgewiesen werden. Die Korrelation zwischen der Menge an HBV-DNA und -RNA könnte darauf hinweisen, dass die Nukleinsäuren direkt über lokal induzierte Mechanismen im Nierengewebe zur entzündlichen Glomerulonephritis führen [87].

Darüber hinaus sind virusassoziierte Glomerulonephritiden mit vielen weiteren Virusinfektionen verbunden (siehe Tabelle 2). Akute Glomerulonephritiden wurden im Zusammenhang mit Parvovirus B19 beobachtet [164] sowie mit Epstein-Barr-Virus-[107] und Hepatitis-A-Infektionen [9].

1.4 Glomeruläre Filtrationsbarriere und glomeruläres Endothel

Anatomisch lässt sich das Nierenparenchym in die Nierenrinde und das Nierenmark unterteilen. Die funktionellen Einheiten bestehen aus Nierenkörperchen und angeschlossenem Tubulussystem und heißen Nephrone. Nierenkörperchen bilden den filternden Bestandteil eines Nephrons und sind aus einem kapillaren Gefäßknäuel (Glomerulus) und der umhüllenden Bowman-Kapsel aufgebaut. Eine funktionell intakte Blut-Harn-Schranke erfordert die regelrechte Struktur der glomerulären Filtrationsbarriere aus glomerulären Endothelzellen, Podozyten und einer dazwischenliegenden gemeinsamen Basalmembran. Die Niere und insbesondere die glomeruläre Filtrationsbarriere entstehen nach komplexen Vorgängen während der embryonalen Nephrogenese. Unter den zahlreichen Einflussgrößen für die ordentliche Ausreifung von glomerulären Endothelzellen besitzen Podozyten eine wesentliche Bedeutung, die mit diversen Wachstumsfaktoren, darunter VEGF-A (*vascular endothelial growth factor A*), Proliferation, Struktur und Differenzierung lenken, indem VEGF-A an den von glomerulären Endothel exprimierten VEGF-Rezeptor 2 (VEGFR2) bindet und eine entsprechende Organisation von Aktin und somit des Zytoskeletts bewirkt

[161]. Da dieser Vorgang nicht nur in der Embryonalentwicklung, sondern auch bei der Aufrechterhaltung der Endothelstruktur bedeutend ist, wirkt sich eine Schädigung der Podozyten problematisch bei glomerulär entzündlichen Erkrankungen aus, da die Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere abnimmt [102, 123]. Die Basallamina der Podozyten ist mit der der Endothelzellen verschmolzen, sodass sich eine mit 240 -370 nm deutlich dickere Basalmembran ausbildet als in anderen Gefäßen (ca. 40-80 nm). Wesentlich für ihre Funktion ist ihre komplexe Struktur aus Kollagen IV, Laminin, Fibronectin, Glykoproteinen und Heparansulfat-reichen Proteoglykanen, die mit ihrer negativen Ladung die Filtration anionischer Proteine verhindern. Einige Studien zeigten, dass die glomeruläre Schrankenfunktion nicht alleine von der Basalmembran bestimmt wird, sondern erst im Zusammenspiel mit Endothel und Epithel zustande kommt [46, 123, 132].

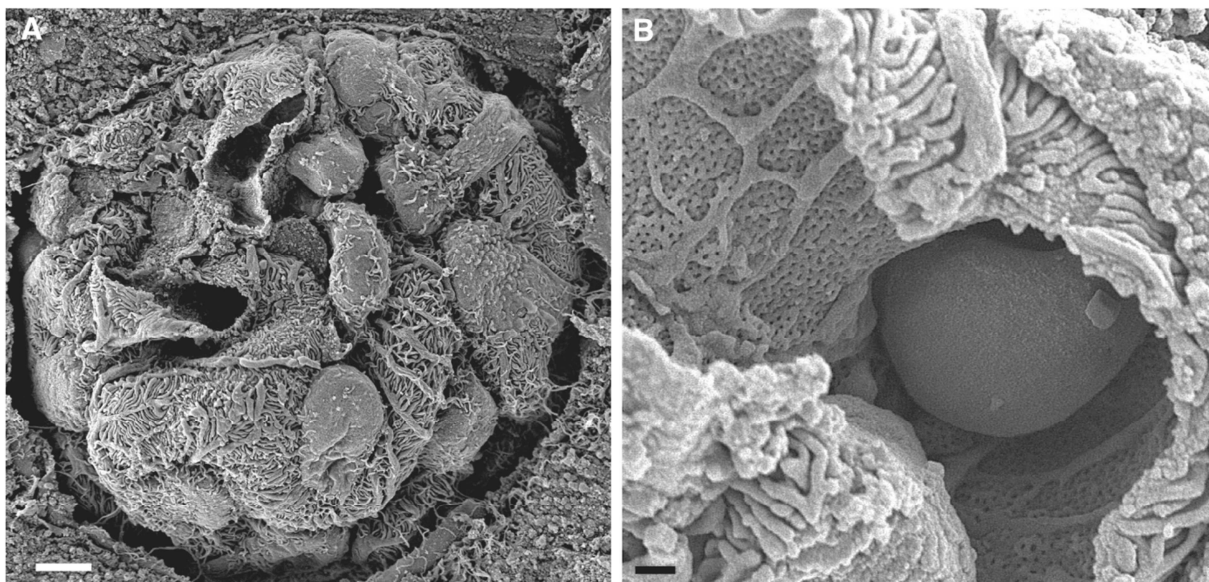


Abbildung 5: Elektronenmikroskopische Aufnahme, aus [46]. Links ein muriner Glomerulus (A) mit Kapillarschlingen, angeschnittenen Endothellumina und sichtbaren Podozytenfußfortsätzen. Rechts (B) die Innenansicht einer glomerulären Kapillare. Deutlich zu erkennen ist die endotheliale Fensterung. Die Skala in A entspricht 10 µm, in B 1 µm.

Das Endothel der glomerulären Kapillaren ist bisher noch recht wenig erforscht, was an seiner verborgenen Lokalisation inmitten des Glomerulus liegt, die eine *in-vivo*-Untersuchung erschwert. Glomeruläre Endothelzellen besitzen besonders geartete Fenestrae (Abbildung 5) und sind für Wasser, Harnstoff, Natrium und kleine Proteine durchlässig. Die Fenestrationen haben einen Durchmesser von etwa 60 – 80 nm und besitzen im Gegenteil zu den sonst

fenestrierten Endothelien keine Diaphragmen, weshalb sie auch als „Poren“ bezeichnet werden [136]. Dabei sind die Öffnungen so angeordnet, dass sie sich direkt gegenüber der Schlitz der Podozytenfußfortsätze befinden (Abbildung 6). Inzwischen zeigten einige Studien, dass dem glomerulären Endothel mit seiner speziellen Zelloberfläche und stark negativ geladenen Proteoglykanen neben der Basalmembran eine wichtige Rolle bei der Schrankenfunktion zukommt, indem es eine selektive Barriere aufbaut [26, 62, 63, 144]. Die Beteiligung der Glykokalix des glomerulären Endothels scheint insbesondere für die Barrierefunktion gegen Albumin von Bedeutung zu sein [46, 143]

Da die glomerulären Endothelzellen die Gefäßschlingen der Glomeruli auskleiden, stehen sie direkt mit dem Blutstrom und darin befindlichen Partikeln in Kontakt. Dies erklärt ihre besondere Bedeutung für die vorliegenden Studien (siehe Hypothese, Kapitel 1.8).

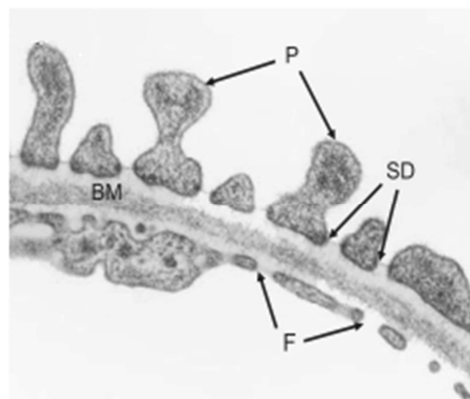


Abbildung 6: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Glomerulären Filtrationsbarriere, aus [136]. Die Bestandteile der glomerulären Filtrationsbarriere sind gut zu erkennen: Das glomeruläre Endothel mit seiner charakteristischen Fensterung (F) kleidet die luminalen Seite aus, gegenüber sind die Fußfortsätze der Podozyten (P) mit ihren Schlitzdiaphragmen (SD) lokalisiert. Dazwischen befindet eine gemeinsame Basalmembran (BM). Vergrößerung: 48.000-fach.

1.5 Das Immunsystem

Das Immunsystem umfasst all die Komponenten, die einen Schutz gegen Krankheitserreger, Mikroorganismen, Fremdsubstanzen und körpereigene, potentiell schädliche Zellen aufbauen. Als „immun“ (von lat. *immunis*: frei, unberührt) bezeichnet man im medizinischen Zusammenhang also Organismen, die gegenüber bestimmten Krankheiten unempfindlich und resistent sind. Aufgabe des Immunsystems ist es, die körperliche Unversehrtheit aufrecht zu erhalten, indem es exogene und endogene Pathogene erfolgreich abwehrt. Hierzu ist ein präzises Unterscheidungsvermögen von großer Bedeutung, um zwischen „selbst“ und „fremd“ zu differenzieren. Fast immer ist an einer Immunantwort ein komplexes Zusammenspiel humoraler und zellulärer Mechanismen beteiligt, weshalb man das Immunsystem nicht nur anhand dieser Merkmale klassifiziert, sondern auch ein angeborenes (unspezifisches) von einem adaptiven (erworbenen, spezifischen) Immunsystem unterscheidet [79].

1.5.1 Das angeborene (unspezifische) Immunsystem

Grundlage des angeborenen (unspezifischen) Immunsystems sind Mechanismen, die schon von Geburt an bereitstehen und beim Erstkontakt mit Pathogenen einsetzen. Oft findet dieser an den Körperoberflächen statt, weshalb bereits dort erste Barrieren in Form von Epithelien existieren. Die Haut bildet das resistente Stratum corneum, während der Respirationstrakt von einer Schleimhaut ausgekleidet ist, deren dünnflüssiger Schleim mit Mucinen, Defensinen, Lysozym, Lactoferrin und IgA-Antikörpern für eine unspezifische Krankheitsabwehr sorgt. Nicht zuletzt komplettieren weitere Komponenten die unspezifische Immunantwort: Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Phagozytose durch neutrophile Granulozyten oder Makrophagen und die Aktivierung des Komplementsystems, das zur Lyse pathogener Mikroorganismen oder zur Opsonierung führt, d.h. zur beschleunigten Phagozytose [108]. Diese Antwort ist grundsätzlich gegen jegliche Fremdkörper gerichtet und daher relativ unspezifisch. Das vielfältige Zusammenspiel von Zellen und Mediatoren führt zu den klassischen Kardinalsymptomen der Entzündungsreaktion, indem es zur Vasodilatation mit vermehrtem Blutzustrom kommt (Rubor, Calor), außerdem zur erhöhten Gefäßpermeabilität mit resultierendem Ödem (Tumor) und gesteigerter Diapedese sowie zu Schmerzempfinden (Dolor) und der gestörten Funktion (Functio laesa) [79].

Innerhalb des angeborenen unspezifischen Immunsystems existieren gewisse spezifisch gegen pathogene Erreger gerichtete Abwehrstrategien. Diese beruhen auf der Erkennung charakteristischer pathogenassoziierter Strukturmoleküle, sog. *Pathogen-associated Molecular Patterns* (PAMP). Diese Strukturmuster sind in der natürlichen Umgebung unveränderliche, sich wiederholende Bestandteile von Krankheitserregern, also bakteriellen, viralen oder mykologischen Ursprungs, demzufolge Kohlenhydrat-, Lipid-, Peptidverbindungen oder Nukleinsäuren. Die Liganden weisen spezielle Strukturen auf, die von Rezeptoren gebunden werden und eine entsprechende Signalkaskade einleiten [73].

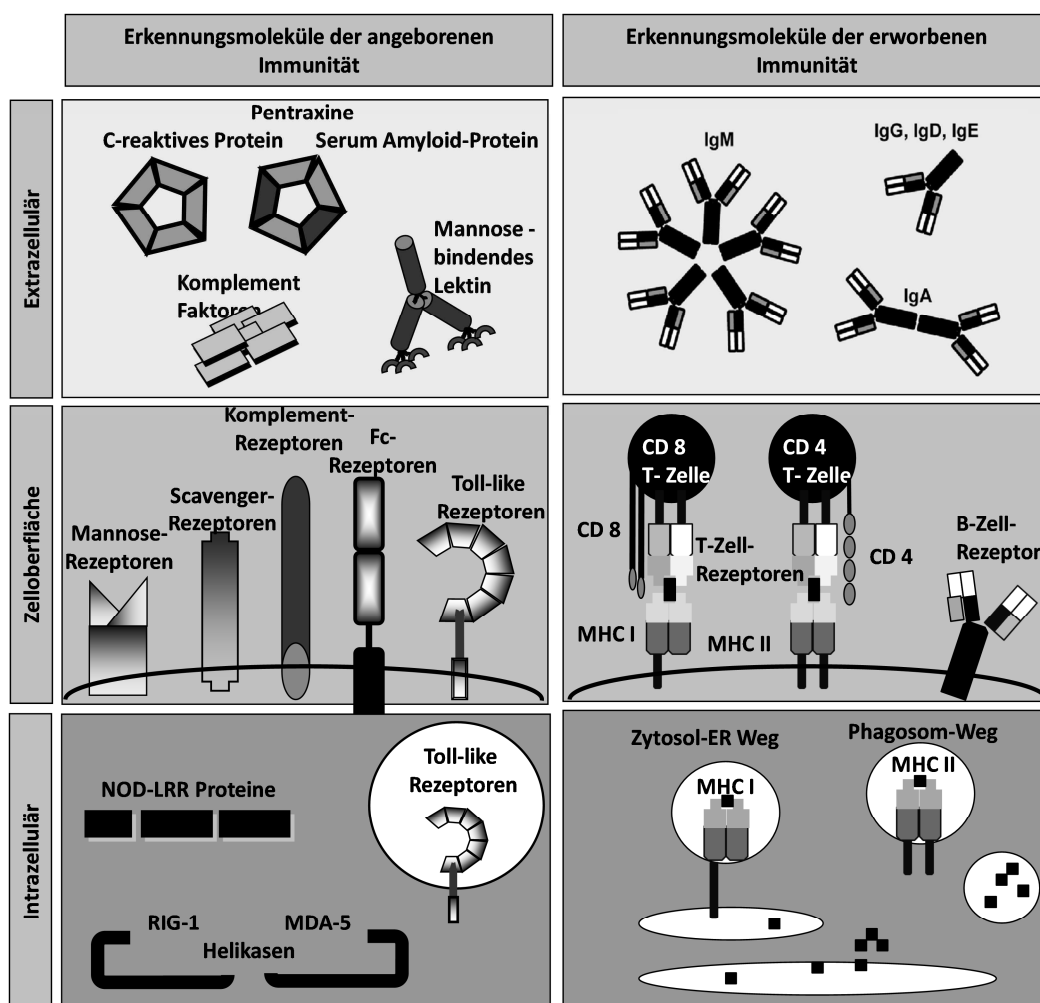


Abbildung 7: Erkennungsmoleküle der angeborenen und erworbenen Immunität (modifiziert aus [7]). Erkennungsmoleküle und Pathogenerkennungsrezeptoren existieren im Extrazellulärraum, auf der Membranoberfläche und im Intrazellulärraum. Zu den Erkennungsmolekülen der angeborenen unspezifischen Immunität gehören Komplementfaktoren, Toll-like-Rezeptoren (TLR) und NOD-like- (NLR) sowie RIG-like-Rezeptoren (RLR). Die Erkennungsmoleküle des erworbenen Immunsystems umfassen Immunglobuline, B-Zell- und T-Zell-Rezeptoren und Proteine der MHC-Klasse-Komplexe (*Major Histocompatibility Complex*). Abk.: CD: Cluster of Differentiation; Ig: Immunglobulin; LRR: Leucine-rich repeat; MDA: Melanoma differentiation associated gene; NOD: Nucleotide-binding oligomerization domain; RIG: Retinoid acid inducible gene

Man bezeichnet die Pathogenerkennungsrezeptoren als *Pathogen Recognition Receptors* (PRR), zu denen verschiedene Rezeptorfamilien gehören: sog. *Toll-like receptors* (TLR), *Nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD)-*like receptors* (NLR) und die *Retinoic-acid-inducible gene-I* (RIG-I)-*like receptors* (RLR) oder *RIG-like helicases* (RLH) [79, 103]. Vermutlich erfolgt die angeborene Immunantwort durch ein synergistisches Zusammenspiel dieser drei Rezeptorfamilien und deren Signalwege [23, 74]. Abbildung 7 zeigt eine Übersicht über die diversen bei der Erkennung beteiligten Moleküle.

1.5.2 Das erworbene (adaptive) Immunsystem

Das erworbene (adaptive, spezifische) Immunsystem höherer Organismen generiert eine spezifisch gegen ein Pathogen gerichtete Immunantwort, die zudem ein immunologisches Gedächtnis ausbildet, um einen langfristigen Schutz zu gewährleisten. Im Mittelpunkt dieser Reaktion stehen B- und T-Lymphozyten, außerdem sind Akute-Phase-Proteine, das Komplementsystem, Zytokine, Interferone und andere Mediatoren wesentlich beteiligt [79]. In seiner Immunantwort zeichnet sich das erworbene Immunsystem durch eine größere Diversifizität, Spezifität und Anpassungsfähigkeit an das Pathogen aus als das angeborene. Ziel der adaptiven Immunantwort ist es, zu jeder möglichen Struktur eines Pathogens (Antigen) eine gezielte Abwehrreaktion zu entwickeln. Diese umfasst neben zellulären Mechanismen vor allem die Synthese passender Bindeproteine, z.B. Antikörper. Bis eine adaptive Immunantwort erfolgt ist, vergehen in der Regel mehrere Tage, danach bleibt die Immunität aufgrund von Gedächtniszellen für längere Zeit aufrechterhalten. Für den Ablauf einer adaptiven Immunreaktion sind Antigenpräsentierende Zellen (APC) und B- und T-Lymphozyten von großer Bedeutung. Die humorale Antwort wird im Wesentlichen von B-Zellen vermittelt, die an ihrer Zelloberfläche einen jeweils einzigartigen Antikörper tragen, den sog. B-Zell-Rezeptor. Mit diesem interagieren sie mit dem Antigen und differenzieren sich in antikörperproduzierende Plasmazellen oder Gedächtniszellen. Zellulär erfolgt die Immunantwort durch T-Zellen, die mit ihrem T-Zell-Rezeptor nur Antigene wahrnehmen, die an membranständige sog. *Major Histocompatibility Complex Molecules* (MHC-Moleküle) gebunden sind. Je nach T-Zell-Subpopulation bewirkt deren Aktivierung unterschiedliche Reaktionen. CD4-positive T-Helferzellen (T_H-Zellen) erkennen auf Antigenpräsentierenden Zellen an MHC-Klasse-II gebundene Antigene und sezernieren daraufhin diverse Zytokine zur Aktivierung von B-Zellen, CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen (T_C-Zellen),

Makrophagen und einer Vielzahl anderer bei der Immunantwort beteiligten Zellen. T_C-Zellen werden durch Bindung an Antigen-MHC-Klasse-I-Proteinkomplexe aktiv und differenzieren sich zu zytotoxischen T-Lymphozyten, die den Zelltod der erkannten Zelle einleiten. Da über die MHC-Klasse-I-Molekülkomplexe intrazellulär synthetisierte Proteine präsentiert werden, kommt ihnen bei der Abwehr virusinfizierter Zellen, Tumorzellen oder Geweben fremder Organismen (Transplantaten) eine wichtige Aufgabe zu. Sowohl die humorale als auch die zelluläre adaptive Immunantwort erfordert somit die Aktivierung von T_H-Zellen. Um diese zu gewährleisten, erfüllen die Antigenpräsentierenden Zellen, zu denen B-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen gehören, besondere Anforderungen. Sie internalisieren Antigenbestandteile und exprimieren diese über membranständige MHC-Klasse-II-Moleküle. Gleichzeitig bilden sie ein costimulatorisches Signal, sodass die T_H-Zelle aktiviert wird [79]. Für die vorliegende Arbeit sind hauptsächlich die Mechanismen der angeborenen Immunantwort und der Pathogenerkennungsrezeptoren von großer Bedeutung, sodass auf eine nähere Erläuterung des adaptiven Immunsystems hier verzichtet wird.

1.6 Immunabwehr viraler Nukleinsäuren

1.6.1 Toll-like Rezeptoren (TLR)

Namensgeber für die sog. Toll-like Rezeptoren (TLR) war das Protein *Toll*, dem eine wichtige Aufgabe bei der Abwehr von Pilzinfektionen bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* zukommt [89]. Schon lange war bekannt, dass sog. Endotoxin bzw. Lipopolysaccharid (LPS) als Bestandteil bakterieller gramnegativer Zellwände große immunstimulatorische Wirkung zeigt, indem es Fieberreaktion und Schocksymptomatik hervorruft. Mitte der 90er Jahre fand man heraus, dass LPS vom damals entdeckten Toll-Rezeptor gebunden wird und eine Immun- und Entzündungsreaktion auslöst. Dieser Rezeptor ist inzwischen als Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) bezeichnet, denn seitdem wurden 13 Toll-like Rezeptoren identifiziert, die sich je nach Spezies geringfügig unterscheiden: Mäuse exprimieren TLR 1-9 und 11-13, Menschen TLR 1-10. Innerhalb der Zelle sind TLR an verschiedenen Orten lokalisiert, so befinden sich die TLR 3, 7, 8 und 9 auf der endosomalen Membran, die anderen TLR auf der Plasmamembran [2, 8].

Toll-like-Rezeptoren sind Typ-1-Transmembranproteine, die aus einer leucinreichen Ektodomäne (*leucin-rich repeats*, *LRR*), einer Transmembrandomäne und einer

intrazellulären Toll-Interleukin-1- (IL-1) Rezeptor- (TIR) Domäne aufgebaut sind. Dabei vermittelt die Ektodomäne die Erkennung von pathogenassoziierten Strukturmustern (PAMPs), während die intrazelluläre TIR-Domäne für die Signaltransduktion relevant ist [74]. Die Ektodomäne ist bei der Wahrnehmung von diversen Liganden involviert, darunter Proteine (wie z.B. Flagellin), Zuckermoleküle (z.B. Zymosan), Lipopolysaccharide (LPS), Nukleinsäuren (CpG-DNA, virale RNA) und diverse Derivate von Kohlenhydraten, Proteinen und Lipiden [3].

Die membranständigen Toll-like Rezeptoren detektieren unterschiedliche mikrobielle oder virale Strukturen, im Folgenden werden hauptsächlich die intrazellulären TLR 3, 7, 8 und 9 genauer erläutert, da sie in der Lage sind, Nukleinsäuren zu binden. Tabelle 3 und Abbildung 8 zeigen einen Überblick über die bei der Virusabwehr beteiligten TLR sowie über RIG-like Rezeptoren und DNA-Sensoren (vgl. auch 1.6.2 und 1.6.3).

Tabelle 3: Erkennung von Nukleinsäuren durch Pathogenerkennungsrezeptoren (PRR) [7, 177]

PRR		Virale Nukleinsäuren	Synthetische Liganden
TLR	TLR3	dsRNA	Poly I:C-RNA
	TLR7/8	ssRNA	Imidazoquinoline, Oligoribonukleotide (ORN)
	TLR9	CpG-DNA	Oligodesoxynukleotide (ODN)
RLR	RIG-I	5'-PPP-dsRNA	In-vitro-RNA
	MDA5	dsRNA	Poly I:C-RNA
	LGP2	dsRNA	Poly I:C-RNA
DNA-Sensoren	DAI/ZBP1	dsDNA (B-DNA)	Poly dA/dT-DNA
	Unbekannte	ssDNA (?), dsDNA (?)	(?)

Abkürzungen (s. auch Abk.-Verzeichnis): CpG: Cytosin-phosphatidyl-Guanin; DAI: DNA-dependent activator of IRF; dsDNA: Doppelsträngige DNA; dsRNA: Doppelsträngige RNA; LGP: Laboratory of genetics and physiology; MDA: Melanoma differentiation associated gene; Poly dA/dT-DNA: Poly(Desoxy-Adenosin-Thymidyl)-Säure; Poly I:C-RNA: Poly-Inosin:Poly-Cytidyl-Säure; PPP: Triphosphat; RIG: Retinoid acid inducible gene; RLR: RIG-like Rezeptor; ssDNA: Single stranded (einzelsträngige) DNA; ssRNA: Single stranded (einzelsträngige) RNA; TLR: Toll-like Rezeptor; ZBP: Z-DNA-binding protein;

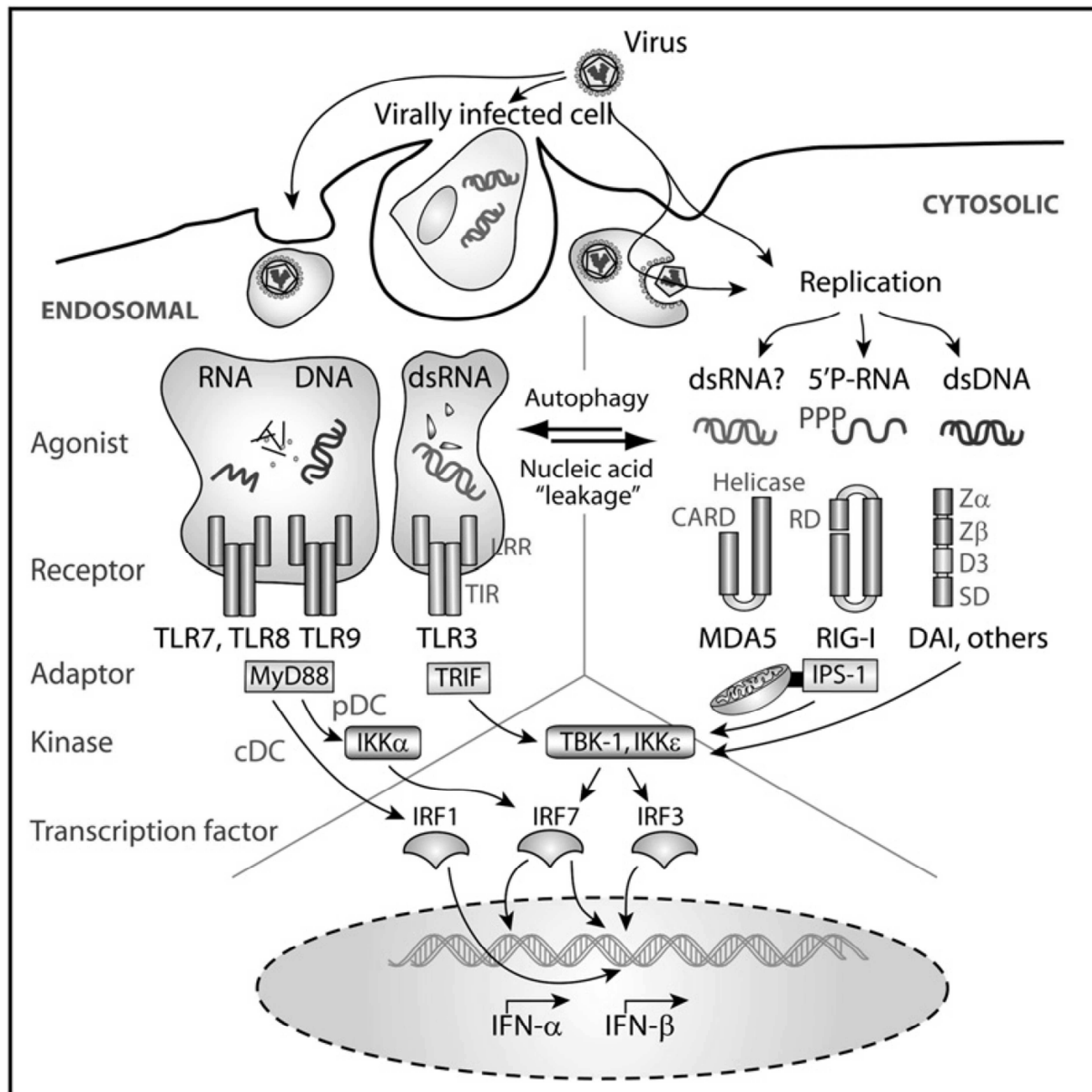


Abbildung 8: Rezeptoren der viralen Erkennung, aus [118]. Dargestellt ist eine Übersicht der Rezeptoren von viralen Nukleinsäuren in plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC). Virale Nukleinsäuren werden von membranständigen Toll-like Rezeptoren (TLR) sowie intrazellulären RIG-like Rezeptoren (RIG-1, MDA5) oder DNA-Sensoren (DAI) gebunden und aktivieren Transkriptionsfaktoren für Typ-I-Interferon.

Abk.: dsDNA: Doppelsträngige DNA; dsRNA: Doppelsträngige RNA; IFN: Interferon; IKK: IκB Kinase; IRF: Interferonregulierender Faktor; IPS: Interferon β promoter stimulator; MDA: Melanoma differentiation associated gene; MyD88: Myeloid differentiation primary response gene 88; RIG: Retinoid acid inducible gene; TBK: TANK-binding kinase; TRIF: TIR-containing adaptor inducing Interferon β

TLR3 bindet doppelsträngige poly I:C-RNA, genomische Reoviren-RNA und doppelsträngige RNA (dsRNA), die während der Replikation von Einzelstrang-RNA-Viren (Respiratorisches Synzytial-Virus RSV, Enzephalomyokarditisvirus EMCV, West-Nile-Virus WNV) entsteht [3, 72]. Klinisch-experimentell zeigt sich diese Funktion darin, dass TLR3-defiziente Mäuse letale Infektionen mit murinen Cytomegalieviren erleiden [148], TLR3-defiziente Menschen

eine erhöhte Anfälligkeit für Infektionen mit Herpes-simplex-Virus 1 (HSV-1) [178]. Exprimiert wird TLR3 nicht nur in klassischen Immunzellen wie dendritischen Zellen oder Makrophagen, sondern auch in Fibroblasten oder Epithelzellen [73].

TLR7 und TLR8 sind sich phylogenetisch sehr ähnlich und reagieren auf synthetische antivirale Imidazoquinolin-Bestandteile wie Resiquimod (R848), Imiquimod und auf virale guanosin- oder uridinreiche Einzelstrang-RNA (ssRNA), wie die von HI- oder Influenzaviren [28, 47, 49]. TLR7 ist sehr stark auf sog. *plasmacytoid dendritic cells* (pDCs), einer Subspezies der dendritischen Zellen, exprimiert [42].

TLR9 erkennt unmethylierte Cytosin-phosphatidyl-Guanin- (CpG-)DNA-Motive einzelsträngiger (bakterieller und viraler genomischer) DNA. Aktivatoren von TLR9 sind murine Cytomegalieviren (MCMV), HSV-1 und HSV-2. Da die Sequenzen der Wirtszelle in der Regel methyliert sind, bindet TLR9 sie kaum, sodass auf diese Weise eine Unterscheidung zwischen selbst und fremd stattfindet [48, 50, 83, 96, 148].

An den Signalwegen sind diverse Adaptermoleküle beteiligt: Die TIR-Domäne interagiert mit MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*), TIRAP (*TIR-containing adaptor protein*), TRIF (*TIR-containing adaptor-inducing Interferon β*) oder TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*). Im weiteren Signalweg werden MAP-Kinasen (*mitogen-activated protein kinases*) und Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B (*nuclear factor κ B*) und IRF (*Interferon regulatory factors*) aktiviert, die eine Produktion von inflammatorischen Zytokinen und Typ-I-Interferon bewirken. MyD88 und TIRAP induzieren die Synthese proinflammatorischer Zytokine, während TRIF und TRAM die Interferonausschüttung einleiten [84] (Abbildung 9). Am Ende der über TLR 3, 7, 8 und 9 vermittelten Signalwege steht die antivirale Immunantwort, die durch Ausschüttung von Typ-I-Interferon und inflammatorischen Zytokinen gekennzeichnet ist. Meist erfolgt die Immunreaktion im Zusammenspiel mit anderen Pathogenerkennungsrezeptoren wie RLR, NLR und weiteren, bislang unbekannten Bindeproteinen, die für die angeborene und auch für die adaptive Immunantwort von Bedeutung sind [74, 75].

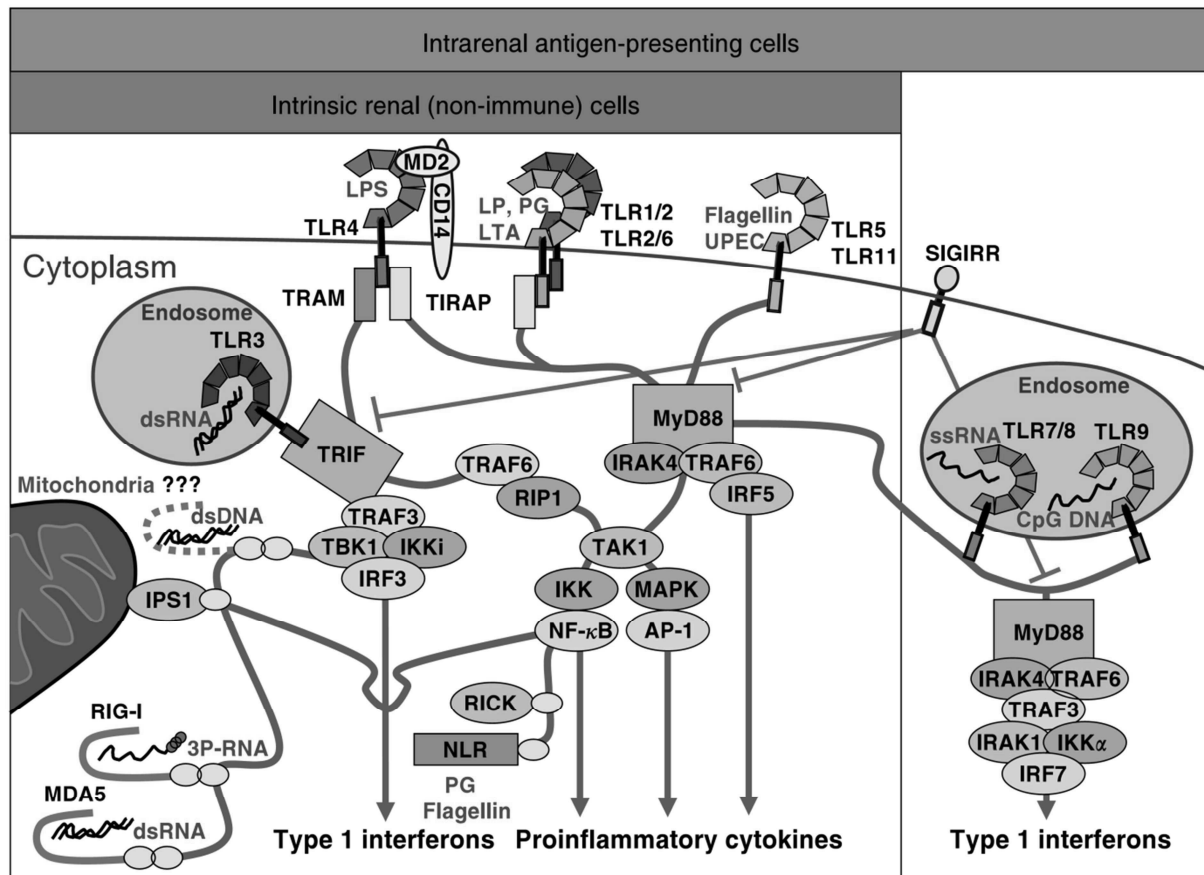


Abbildung 9: Intrazelluläre Signalwege bei Aktivierung von Toll-like Rezeptoren (TLR), RIG-like Rezeptoren (RLR) und NOD-like Rezeptoren (NLR), aus [7]. Die entsprechenden Liganden sind mit roter Schrift gekennzeichnet. Intrinsische renale Nicht-Immunezellen exprimieren verglichen mit intrarenalen antigenpräsentierenden Zellen ein limitiertes Spektrum an TLR und möglicherweise auch RLR und NLR. Ob und mit welcher funktionellen Bedeutung RLR und NLR in diesen renalen Zellen vorhanden sind, wurde bislang noch nicht exakt beschrieben. TLR erzeugen über die Adaptermoleküle MyD88, TIRAP, TRIF und TRAM, RLR (RIG-I, MDA5) über das mitochondriale Adapterprotein IPS-1 und NLR über RICK eine Immunantwort, die zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Typ-I-Interferon führt.

Abk.: dsDNA: Doppelsträngige DNA; dsRNA: Doppelsträngige RNA; IPS: Interferon β promotor stimulator; MDA: Melanoma differentiation associated gene; MyD88: Myeloid differentiation primary response gene 88; RICK: Rip-like interacting CLARP kinase; RIG: Retinoid acid inducible gene; TIR: Toll/interleukin-1 receptor; TIRAP: TIR-containing adaptor protein; TRAM: TRIF-related adaptor molecule; TRIF: TIR-containing adaptor inducing Interferon β

1.6.2 RIG-like Rezeptoren (RIG-like Helikasen)

RIG-like Rezeptoren (RLR) dienen als zytosolische Rezeptoren der Nukleinsäure-Erkennung und existieren nicht nur hauptsächlich in dendritischen Zellen, sondern in vielen Zelltypen [23, 67]. Zur Gruppe der RLR zählen *Retinoid acid inducible gene 1* (RIG-I), *Melanoma differentiation associated gene 5* (MDA5) und *Laboratory of genetics and physiology 2* (LGP2) [73, 175]. Diese Rezeptoren sind Helikasen, die nach Bindung viraler RNA mittels

des Adaptermoleküls *Interferon β promoter stimulator 1* (IPS-1) die Produktion inflammatorischer Zytokine und Typ-I-Interferone vermitteln. IPS-1 heißt auch *Mitochondrial anti-viral signaling* (MAVS), *Caspase recruitment domain* (CARD) *adapter inducing Interferon β* (Cardif) oder *Virus-induced signaling adapter* (VISA) und befindet sich an der äußeren Mitochondrienmembran [72, 176].

RIG-I spielt bei der Erkennung verschiedener einzelsträngiger RNA-Viren wie Paramyxovirus, Influenzavirus A und Japanische-Enzephalitis-Virus eine wichtige Rolle, MDA5 bei der Erkennung von Picornaviren und poly I:C-RNA, weshalb RIG-I- und MDA5-defiziente Mäuse für diese Virusinfektionen generell stärker anfällig sind als entsprechende Wildtypen [74]. RIG-I und MDA5 weisen spezifische Unterschiede in der Erkennung von RNA auf, so bindet RIG-I einzelsträngige 5'-Triphosphat-RNA (3P-RNA) und kurze doppelsträngige RNA, MDA5 lange doppelsträngige RNA (dsRNA) und poly I:C-RNA [9, 69, 93] (siehe Tabelle 3 und Abbildung 8).

1.6.3 Zytoplasmatische DNA-Sensoren

Virale doppelsträngige DNA stimuliert diverse Zelltypen über zytoplasmatische DNA-Sensoren zu einer antiviralen Immunantwort (Abbildung 8). Als einziger zytoplasmatischer Rezeptor für DNA wurde bisher *DNA-dependent activator of IRF* (DAI), auch bekannt als *Z-DNA-binding protein 1* (ZBP1), identifiziert, der die Ausschüttung von Typ-I-Interferon einleitet [149]. Jedoch scheint DAI/ZBP1 nur eine redundante Rolle bei der DNA-Erkennung zu spielen, sodass man die Existenz weiterer DNA-Sensoren annehmen muss [56]. Zudem kann virale DNA durch die *RNA-Polymerase III* zu 5'-Triphosphat-RNA, einem RIG-I-Liganden, umgewandelt werden [1, 20]. Eine dritte Möglichkeit der DNA-Erkennung erfolgt über das sog. *Inflammasom*. Interessanterweise induziert die in der Natur übliche rechtsgängige DNA-Doppelhelix (B-DNA) eine starke Immunantwort, die linksgängige Z-DNA oder einzelsträngige DNA jedoch kaum [60].

1.6.4 Nod-like Rezeptoren und das Inflammasom

Die sog. Nod-like-Rezeptoren (NLR) umfassen eine große Gruppe von zytoplasmatischen Pathogenerkennungsrezeptoren. Zu ihnen gehören verschiedene Proteine, u.a. NOD1, NOD2,

außerdem bilden einige von ihnen das sog. Inflammasom, ein zytosolischer Proteinkomplex, der zur Interleukin-1 β -vermittelten Entzündungsreaktion führt. Die Triggerfaktoren für das Inflammasom sind zahlreich, im Folgenden wird lediglich auf die bei der Erkennung von Nukleinsäuren beteiligten Komponenten eingegangen. Beispielsweise spielt bei der Immunantwort des Influenzavirus A ein Inflammasom aus *NLR family, pyrin domain containing 3* (NLRP3), auch bekannt als *NACHT*-, *LRR*- and *PYD*-containing protein 3 (NALP3) und *cryopyrin*, eine wichtige Rolle und induziert die Ausschüttung inflammatorischer Zytokine der IL-1 β -Familie [10, 109].

Besondere Bedeutung für die Erkennung zytosolischer DNA und die nachfolgende IL-1 β -Ausschüttung hat das *AIM2-Inflammasom* (*absent in melanoma 2*). Die Funktion solcher Inflammasomen ist noch weitgehend unerforscht [55].

1.6.5 Zytokinausschüttung nach Erkennung viraler Nukleinsäuren

Die Erkennung viraler Nukleinsäuren durch Pathogenerkennungsrezeptoren (PRR) mündet in die Produktion proinflammatorischer Zytokine, Chemokine und Typ-I-Interferone. Diese Zytokine haben unterschiedlichste Auswirkungen auf das Zusammenspiel und den Metabolismus beteiligter und benachbarter Zellen.

Inflammatorische Zytokine

Eine Entzündungsreaktion lässt sich als vielfältiges Wechselspiel von Zellen und Mediatoren beschreiben. Wesentlichen Anteil daran haben Zytokine. Dies sind Proteine, die grundlegende Zellvorgänge wie Wachstum, Differenzierung und Zellfunktion regulieren. Die Gruppe der Zytokine mit Wirkung auf das Immunsystem umfasst eine Vielzahl von Zytokinklassen, zu denen Interleukine (IL), Chemokine, Interferone (IFN) und Proteine der Tumor-Nekrose-Faktor- (TNF-) Familie gehören. Interleukine bestimmen wesentlich die Kommunikation zwischen den an einer Immunantwort beteiligten Makrophagen, B- und T-Lymphozyten, dendritischen und anderen involvierten Zellen. Es existieren zahlreiche Interleukine, IL-6 ist ein wichtiger Entzündungsmediator unter ihnen. Neben ihrer lokalen Mediatorfunktion lösen vor allem IL-6 und TNF α systemische Effekte wie Fieber aus [79].

Bei der Entzündungsreaktion haben inflammatorische Chemokine eine wichtige Aufgabe:

sie wirken als chemotaktische Zytokine und rekrutieren Leukozyten zum Entzündungsherd, indem sie die Diapedese und Transmigration von Leukozyten aus dem Blutstrom in das Interstitium und das Auswandern von Immunzellen in periphere lymphatische Organe regulieren [65]. Bis heute wurden über 40 Chemokine identifiziert, deren Nomenklatur sich an der chemischen Struktur orientiert [179].

Zur Zytokingruppe der Interferone gehören Typ-I- und Typ-II-Interferone. Typ-I-Interferon wird speziell bei der antiviralen Immunantwort sezerniert und soll die Replikation der Viren verhindern. Typ-II-Interferon (IFN- γ) hat eine andere Aufgabe: es wird von T-Helferzellen ausgeschüttet und aktiviert Makrophagen, NK-Zellen und neutrophile Granulozyten [141].

Typ-I-Interferon und Interferon-stimulierte Gene

Typ-I-Interferone gelten als wichtigste Komponente einer spezifisch antiviral gerichteten Immunreaktion und haben vielfältige Effekte auf umliegende Zellen und auf Bestandteile des angeborenen und des adaptiven Immunsystems. Ihre Synthese wird von Nukleinsäure-Sensoren (Toll-like Rezeptoren, RIG-like Rezeptoren und DNA-Sensoren) über komplexe Signalwege und die Aktivierung sog. *Interferon-regulierender Faktoren* (IRF) bewirkt, welche als Transkriptionsfaktoren für Typ-I-Interferon fungieren [58, 110]. Zur Gruppe der Typ-I-Interferone gehören mehr als zehn Mitglieder, bei Säugetieren sind dies IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ , IFN- ω , IFN- δ und IFN- τ [119].

Bei der antiviralen Immunantwort entfalten vor allem IFN- α und IFN- β ihre Wirkung über den gemeinsamen Interferon- α/β -Rezeptor (IFNAR), der aus zwei Untereinheiten IFNAR1 und IFNAR2 zusammengesetzt wird [160] (Abbildung 10). Nach Bindung der entsprechenden Zytokine IFN- α/β setzt sich eine durch *Janus-Kinasen* (JAK) und *Signal transducer activator of transcription* (STAT-) Proteine vermittelte Signaltransduktion in Gang [139]. Dabei werden STAT1 und STAT2 von den Janus-Kinasen phosphoryliert, wodurch sie in den Zellkern gelangen und dort mit IRF9 den Transkriptionsfaktorkomplex ISGF3 (*IFN stimulated genes factor*) bilden [93, 152]. ISGF3 induziert die Aktivierung einer sehr großen Anzahl von sog. Interferon-stimulierten Genen (ISG), zu denen beispielsweise 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetasen (OAS), *Myxovirus resistance 1 GTPase* (MX1, oder *interferon-inducible protein p78*) gehören [133].

Die ISG wirken auf verschiedenste Art und Weise antiviral. Die MX1 GTPase baut virale Ribonucleoproteine (RNP) ab, OAS aktivieren die Ribonuklease *RNase L*, die alle

intrazellulär gelegene RNA degradiert, also zelluläre und virale RNA [40]. Außerdem beeinflussen Typ-I-Interferone die Zytokinexpression und verstärken die Produktion von Interleukin 6, Chemokinen wie CXCL10 (auch bekannt als *IFN-inducible protein 10*, IP-10), Chemokinrezeptoren oder TGF- β (*Transforming growth factor β*), einem Protein zur Regulierung von Zellproliferation und –differenzierung [154].

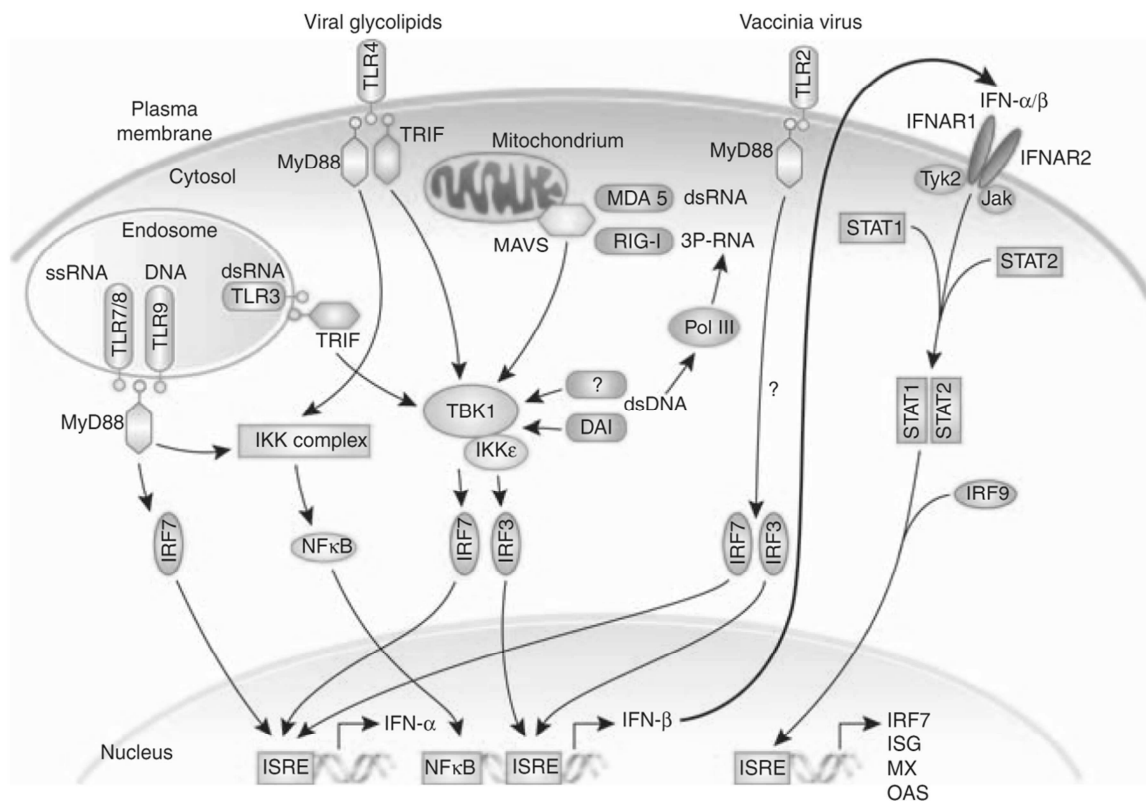


Abbildung 10: Rezeptoren der Nukleinsäure-Erkennung und Interferonsignalnetzwerk.[9] Die Synthese und Effekte von Typ-I-IFN werden über diverse Pathogenerkennungsrezeptoren gesteuert. Endosomale TLR7/8 und TLR9 aktivieren MyD88-abhängig IRF7. Virale dsRNA führt über TLR3 zur TRIF-abhängigen Induktion von IRF3 und IRF7. Zytosolische RLR wie RIG-I und MDA5 binden 5'-Triphosphat-RNA bzw. dsRNA und leiten über IPS-1/MAVS die Phosphorylierung von IRF7 und IRF3 ein. Virale dsDNA induziert über den Rezeptor DAI und andere bislang unbekannte Moleküle der Pathogenerkennung die Produktion von Typ-I-IFN. Außerdem kann dsDNA nach Transkription durch die RNA-Polymerase III in 5'-Triphosphat-RNA über RIG-I eine antivirale Immunantwort auslösen. Die Phosphorylierung von IRF3 und IRF7 bewirkt deren Translokation in den Nukleus, wo sie die Transkription von IFN α und IFN β steuern. Typ-I-IFN bindet parakrin und autokrin an den Interferonrezeptor IFNAR1/2, wodurch über einen JAK/STAT- und IRF9-vermittelten Signalweg ISRE und antivirale Interferon-stimulierte Gene (ISG) aktiviert werden. Durch die Freisetzung von IRF7 kommt es zu einem positiven Rückkopplungsmechanismus, der die Interferonantwort steigert.

Abk.: DAI: DNA-dependent activator of IFN-regulatory factor; dsRNA: doppelsträngige RNA; IFN: Interferon; IFNAR: Type-I-IFN-Rezeptor; IKK: I κ B Kinase; IPS-1: Interferon β promoter stimulator 1; IRF: interferon regulatory factor; ISRE: interferon stimulated response element; JAK: Januskinase; MAVS: Mitochondrial anti-viral signaling; MDA5: melanoma differentiation antigen 5; NF κ B: nuclear factor- κ B; RIG-I: retinoic acid inducible gene-I; ssRNA: Single stranded (einzelssträngige) RNA; STAT: Signal Transducers and Activators of Transcription; TBK: TANK binding kinase; TLR: Toll-like receptor; TRIF: Toll/interleukin (IL)-1 receptor domain-containing adaptor-protein inducing interferon beta.

Zusammenfassend greifen Typ-I-Interferone an der Organisation der antiviralen Immunantwort auf allen Ebenen der angeborenen und adaptiven Immunantwort an, sodass sie als wichtiger Akteur in der virusinduzierten Entzündungsreaktion angesehen werden können.

Typ-I-IFN zeigen pro-apoptotische und antiproliferative Wirkung auf T-Zellen, indem sie Inhibitoren der Zyklin-abhängigen Kinasen (CDK) und pro-apoptotische Effektoren wie Fas-Ligand, p53, Bax/Bak sowie Procaspasen aktivieren [154]. Von Immunzellen ausgeschüttete Typ-I-Interferone besitzen auch Effekte auf die Aktivierung von NK-Zellen, Differenzierung der zytotoxischen T-zellen und Reifung von dendritischen Zellen, in denen sie die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen und damit die Präsentation viraler Antigene hochregulieren, insgesamt also auch auf Mechanismen der adaptiven Immunantwort [146].

Typ-I-Interferone führen in dendritischen Zellen zusätzlich zur Induktion von ISG zur Synthese von IRF7, sodass ein positiver Rückkopplungsmechanismus zustande kommt, der wiederum zur Aktivierung von Interferongen führt. Herunter reguliert werden die von Typ-I-IFN induzierten Signalwege durch Internalisation und Degradation des Rezeptors, Dephosphorylierung der JAK und STAT, durch sog. SOCS (*suppressors of cytokine signaling*, Hemmer der durch Zytokine eingeleiteten Signalwege) und durch PIAS (*protein inhibitors of activated STAT*), welche als Inhibitoren der STAT-Proteine fungieren [93, 154].

1.6.6 Signalwege der Nukleinsäure-vermittelten Zytokin- und Interferonsynthese

Freigesetzt werden proinflammatorische Zytokine und Typ-I-Interferone nach Aktivierung der Sensoren für Virusbestandteile, insbesondere Nukleinsäuren. Membranständige Toll-like Rezeptoren (TLR 3, 7, 8, 9) und zytosolische Rezeptoren (RIG-I, MDA5, sowie bislang unbekannte DNA-Sensoren) stoßen über komplexe Zwischenschritte sog. *IFN-regulated factors* (IRF) an, welche als Transkriptionsfaktoren die Expression und Sekretion von Typ-I-Interferonen bewirken [75]. Besonders bedeutend sind hierbei IRF3 und IRF7, die letztlich die unterschiedlichen upstream gelegenen Signalwege bündeln [52, 137]. Ihre Phosphorylierung führt zur Translokation in den Zellkern, wo sie den Promotor für die Typ-I-IFN-Gene (Interferon α und β) aktivieren [177]. Abbildung 10 zeigt den Weg von der Viruserkennung zur Typ-I-IFN-Produktion und dessen Effekten.

Toll-like-Rezeptoren rekrutieren nach ihrer Aktivierung diverse Adaptermoleküle, sog. *TIR-domain-containing adaptors*. Für TLR 5, 7, 9 und 11 ist dies MyD88, für TLR 1, 2, 4 und 6

zusätzlich zu MyD88 noch TIRAP, für TLR3 TRIF, für TLR4 TRIF und TRAM. Folglich kann man die TLR-Signalwege grob in einen MyD88-abhängigen und einen TRIF-abhängigen Signalweg unterteilen [3, 113, 150] (siehe auch Abbildung 9).

Der MyD88-abhängige Signalweg führt über sog. *IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinasen* (IRAK) zur Aktivierung von NF κ B und MAP-Kinasen [3]. Nach Interaktion mit der E3-Ubiquitinligase TRAF6 (*TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktor 6*) entsteht ein Komplex mit IKK (*I κ B kinase*), der die Freisetzung von NF- κ B erzeugt [14]. Folglich führt der MyD88-abhängige Signalweg zur Induktion zahlreicher inflammatorischer Zytokine (Abbildung 9).

Der TRIF-abhängige (=MyD88-unabhängige) Signalweg vermittelt einerseits über TRAF6 die Aktivierung von NF- κ B, andererseits über die Aktivierung von IRF3 die Produktion von Typ-I-Interferon. Hierzu formt TRIF einen Komplex aus TBK1 (*TANK binding kinase 1*) und IKKi / IKK ϵ (*I κ B Kinase*), der unter Beteiligung von TRAF3 die Phosphorylierung von IRF3 katalysiert und so dessen Translokation in den Zellkern ermöglicht, wo die Transkription von Typ-I-Interferon erfolgt [44, 45, 72] (Abbildung 9 und Abbildung 10).

Zytosolische RIG-like Rezeptoren wie RIG-I oder MDA5 binden 5'-Triphosphat-RNA bzw. dsRNA und induzieren mittels des Adapters IPS-1/MAVS über NF- κ B die Ausschüttung inflammatorischer Zytokine und über den TBK1-/IKK ϵ -Komplex ebenfalls die IRF3- und IRF7-vermittelte Transkription von Typ-I-Interferon [44, 74].

Der zytosolische DNA-Sensor DAI/ZBP1 bindet virale dsDNA, außerdem kann dsDNA nach Transkription durch die RNA-Polymerase III in 5'-Triphosphat-RNA den RIG-1-vermittelten Signalweg anstoßen. Beides leitet über den TBK1/IKK-Komplex die Typ-I-Interferoninduktion ein [1, 20, 60]. Die Formation eines Proteasekomplexes unter Mitwirkung des AIM2-Inflammasoms bewirkt die Caspase-1-vermittelte Freisetzung von IL-1 β -Derivaten [56].

1.7 Glomeruläres Endothel in der Entzündungsreaktion

Entzündungsreaktionen beinhalten ein komplexes Zusammenspiel von Zellen und Mediatoren. Endothel wirkt hierbei als wichtiger Effektor und Regulator mit und involviert Elemente des unspezifischen und des adaptiven Immunsystems. Ruhendes Endothel interagiert kaum mit Leukozyten des Blutstroms. Erst nach Endothelzellaktivierung durch inflammatorische Zytokine kommt es zur Synthese von Stickstoffmonoxid (NO), Prostazyklin (PGI₂), Chemokinen und Adhäsionsmolekülen, die die Extravasation von

Leukozyten vermitteln [92]. Dies ist ein mehrphasiger Prozess, der Leukozytenanlagerung, -adhäsion und -transmigration umfasst und von den endothelialen Adhäsionsmolekülen E-bzw. P-Selektin, ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) und VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*), zusammen mit leukozytären Integrinen gesteuert wird [120], siehe Abbildung 11.

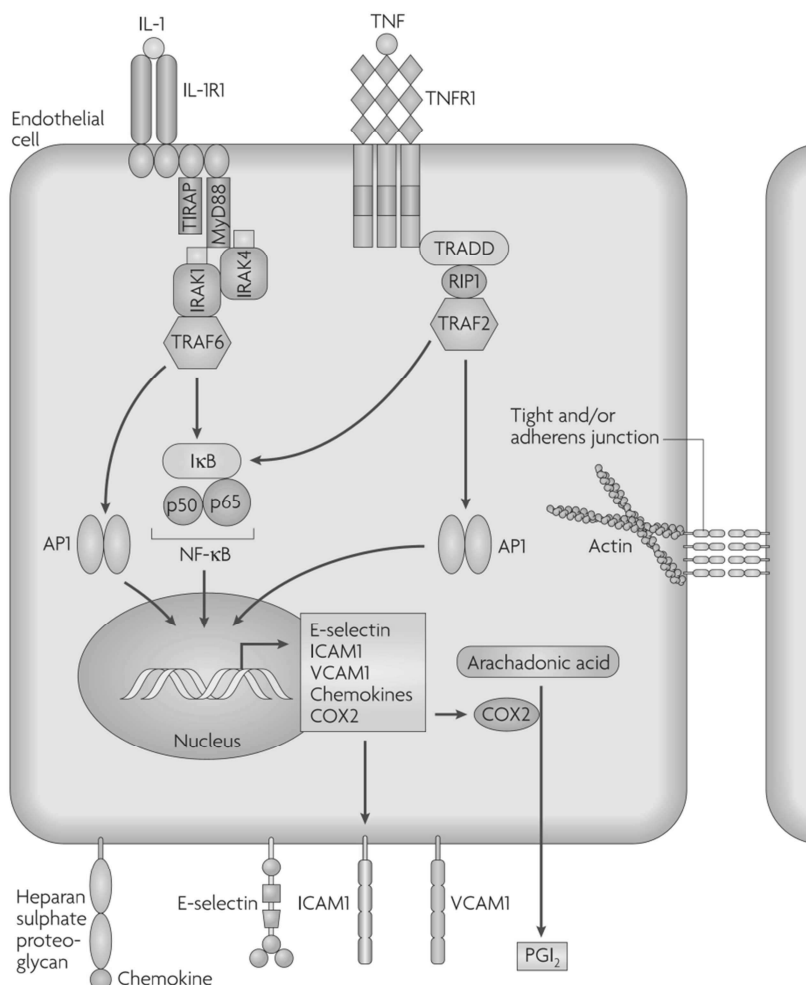


Abbildung 11: Aktivierung von Endothelzellen in der Entzündungsreaktion, aus [120]. Nach Bindung inflammatorischer Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1) oder Tumornekrosefaktor (TNF) an entsprechende IL-1- oder TNF-Rezeptoren setzt sich in Endothelzellen eine Signalkaskade mit der Bildung zahlreicher intrazellulärer Proteinkomplexe in Gang. Von Relevanz für diese Arbeit ist speziell der IL-1-vermittelte MyD88-abhängige Signalweg, der unter Einbeziehung von IL-1-Rezeptor-assoziierten Kinasen (IRAK) und des TNF-Rezeptor-assoziierten Faktors 6 (TRAF6) in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nuclear factor κ B (NF- κ B) mündet. Als Folge werden pro-inflammatorische Proteine und Adhäsionsmoleküle wie das intercellulär adhesion molecule 1 (ICAM-1) und das vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) synthetisiert.

In Bezug auf PRR-vermittelte Immunkompetenz weiß man von glomerulären Endothelzellen, dass sie die Toll-like Rezeptoren 1-6 exprimieren, nicht jedoch den DNA-spezifischen TLR9 [116]. Über die Existenz und Funktionalität all der weiteren in den vorherigen Kapiteln beschriebenen Toll-like Rezeptoren und RIG-like Rezeptoren in glomerulären Zellen und speziell in glomerulären Endothelzellen ist bislang wenig bekannt. Studien an Mesangialzellen legen dar, dass virale RNA über den zytosolischen RIG-like Rezeptor MDA5 zu Zytokinausschüttung und Zelltod führen kann [38].

1.8 Zielsetzung und Hypothese

Die viral-getriggerte Glomerulonephritis bildet eine klinisch relevante Entität innerhalb der Gruppe der entzündlichen Nierenerkrankungen. Virale Infektionen können eine vorbestehende Glomerulonephritis, wie z.B. bei Lupusnephritis oder IgA-Nephropathie, verstärken oder gar eine *de novo* Glomerulonephritis induzieren. Zwar ist die virale Immunantwort klassischer Immunzellen wie dendritischer Zellen bislang relativ gut charakterisiert, jedoch sind die Mechanismen der viralen Antigenerkennung bei der viral-getriggerten Glomerulonephritis unklar, insbesondere ob virale Nukleinsäuren innerhalb der Niere neben Immunzellen auch von renalen Zellen erkannt werden und ob neben der systemischen antiviralen Immunantwort eine lokale Ausschüttung inflammatorischer Zytokine sowie antiviral gerichteter Typ-I-Interferone erfolgt.

Glomeruläre Endothelzellen kleiden die kapillaren Gefäßschlingen innerhalb des Glomerulus aus. Sie stehen direkt mit dem Blut in Kontakt und interagieren somit mit viralen Partikeln, die mit dem Blutstrom in die Niere gelangen [46, 82]. Sie sind in der Lage, mittels proinflammatorischer Zytokine ein entzündliches Milieu zu unterstützen und mit der Produktion von Chemokinen und der Präsentation von Adhäsionsmolekülen zudem die Leukozytenadhäsion und -transmigration zu fördern [120].

Man kennt diverse Rezeptoren der Nukleinsäure-Erkennung in dendritischen Zellen, besonders die Funktion von Toll-like Rezeptoren, RIG-like Rezeptoren und DNA-Sensoren. Glomeruläre Endothelzellen exprimieren gewisse Toll-like-Rezeptoren, nämlich die TLR 1-6 [116]. Möglicherweise kommt glomerulären Endothelzellen als Komponente der glomerulären Filtrationsbarriere eine Beteiligung an der Inflammation zu. Wie von Patole und Allam gezeigt werden konnte, verstärkt eine systemische Applikation der Nukleinsäuren poly I:C-RNA oder B-DNA die Proteinurie nephritischer Mäuse [5, 115]. Es ist bislang ungeklärt,

ob Nukleinsäuren von glomerulären Endothelzellen erkannt werden und diese zu einer inflammatorischen Immunantwort im Sinne einer Endothelaktivierung stimulieren.

Wir vermuteten, dass glomeruläre Endothelzellen virale Nukleinsäuren, die mit dem Blutstrom in die Niere gelangen, erkennen und mittels spezifischer TLR-unabhängiger zytosolischer Rezeptoren der RNA- und DNA-Erkennung eine antivirale Typ-I-Interferon-beinhaltende Immunantwort hervorrufen. Auf diese Weise könnten glomeruläre Endothelzellen mit lokalen antiviralen Abwehrmechanismen zur viral-induzierten Glomerulonephritis beitragen.

Material und Methoden

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte, Chemikalien und Lösungen

Geräte

Zellkultur

24-well-Zellkulturschale	Nunc, Wiesbaden
6-well- Zellkulturschale	Costar Corning, Schiphol-Rijk, Holland
96-well-Zellkulturschale	TPP, Trasadingen, Schweiz
Eppendorf-Gefäße 1,5 ml	TPP, Trasadingen, Schweiz
Falcons 15, 50 ml	BD, Heidelberg
Kryobox Cryo 1 °C freezing container	Nalgene™, Rochester, NY, USA
Kryovials	Alpha Laboratories, Eastleigh, UK
Lichtmikroskop Leitz DM IL	Leica Microsysteme, Solms
LSM510 Lasermikroskop	Carl Zeiss Jena, Jena
Millicell Hanging Cell Culture Inserts	Millipore, Eschborn
Nunc-Immuno™ 96 Microwell™ Plates	Nunc, Wiesbaden
Pipetten Pipetman® P	Gilson, Middleton, WI, USA
Pipettenspitzen 1-1 000 µl Typ Gilson®	Peske, Aindling-Arnhofen
Pipettenspitzen epT.I.P.S. Standard	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetus®-classic	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Plastikfilter 70 µm	BD, Heidelberg
Serologische Pipetten 5, 10, 25 ml	Falcon®/BD, Heidelberg
Steril Card Hood Class II, Typ A/B3	The Baker Company, Sanford, Maine, US
Zellinkubator Type B5060 EC-CO ₂	Heraeus Sepatech, Osterode
Zellkulturschale Ø 96 x 21 mm	TPP, Trasadingen, Schweiz

ELISA

ELISA-Reader Tecan, GENios Plus	Tecan, Crailsheim
ELISA Microplate Strip Washer	ELx50, BioTek, Bad Friedrichshall
Multikanalpipette Eppendorf Research	Eppendorf AG, Hamburg

Durchflusszytometer

FacsCalibur™

BD Bioscience, Heidelberg

RNA-Analyse und real-time RT-PCR

Lightcycler® 480 Real-Time PCR System

Roche Diagnostics Ltd., Rotkreuz, Schweiz

Mini-PROTEAN® II Electrophoresis Cell

BioRad, München

Photometer

Photometer Ultrospec 1000

Amersham, Freiburg

Spektrophotometer Beckman DU® 530

Beckman Coulter, Krefeld

Zentrifugen

Tischzentrifuge 5415D

Eppendorf, Hamburg

Zentrifuge Heraeus, Minifuge T

VWR International, Darmstadt

Zentrifuge Heraeus, Sepatech Biofuge A

Heraeus Sepatech, Osterode

Sonstige Geräte

pH-Meter WTW

WTW GmbH, Weilheim

Thermomixer 5436

Eppendorf, Hamburg

Vortex Genie 2™

Bender&Hobein AG, Bruchsal

Waage Mettler PJ 3000

Mettler Toledo, Gießen

Wasserbad HI 1210

Leica Microsysteme, Solms

Chemikalien

Zellkulturchemikalien

DMEM-Medium

Invitrogen, Karlsruhe

Dulbecco's PBS (1x)

PAA Laboratories GmbH, Cölbe

EDTA (Versen)

Biochrom KG, Berlin

Fetales Bovines Serum (FBS Superior)

Biochrom KG, Berlin

Penicillin-Streptomycin (PS) (100x)

PAA Laboratories GmbH, Cölbe

RPMT-1640-Medium

Invitrogen, Karlsruhe

Trypanblau

Sigma Aldrich, Steinheim

Chemikalien für die Stimulationsexperimente

5'-rhodaminmarkierte B-DNA	TIB MOBIOMOL, Berlin
Chloroquin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chlorpromazin	Merck, Darmstadt
Cytochalasin D	BIOMOL, Plymouth Meeting, PA, USA
FITC-konjugiertes bovines Serum-Albumin	Invitrogen, Karlsruhe
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Methyl- β -cyclodextrin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Murines Interferon- α	AbD Serotec, Martinsried
Murines Interferon- β	PBL, NJ, USA
Murines Interferon- γ	PeproTech INC., London, UK
Opti-MEM® I	Invitrogen, Karlsruhe
Pam3CSK4 (P ₃ C)	Invivogen, Toulouse
Poly dA/dT DNA (B-DNA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Poly I:C RNA	Invivogen, Toulouse, Frankreich
Polymyxin B	Sigma Aldrich, Steinheim
Ultra Pure E. coli LPS	Invivogen, Toulouse

MyD88-Homodimerisations-Inhibitorpeptid-Set

MyD88 homodimerization control peptide	Imgenex San Diego, CA, USA
MyD88 homodimerization inhibitory peptide	Imgenex San Diego, CA, USA

ELISA-Chemikalien

CCL2/MCP-1-ELISA-Kit	BD Bioscience, Heidelberg
CCL5/RANTES-ELISA-Kit	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
CXCL10/IP-10-ELISA-Kit	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
IFN- α -ELISA-Kit	PBL, Piscataway, NJ, USA
IFN- β -ELISA-Kit	PBL, NJ, USA
IFN- γ -ELISA-Kit	BD Bioscience, Heidelberg
IL-6-ELISA-Kit	BD Bioscience, Heidelberg
Substratlösung TMB-Substrate	BD Pharmingen, Heidelberg,

Chemikalien der RNA-Isolation, cDNA-Synthese und real-time RT-PCR

10 x Taq Puffer without detergent	Fermentas, St. Leon-Rot
3-(N-Morpholino)-Propansulfonat (Mops)	Roth, Karlsruhe
5xFirst strand Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
Acrylamid (15 µg/ml)	Ambion, Darmstadt
Agarosepulver	Invitrogen, Karlsruhe
BioStab PCR Optimizer	Bitop, Witten
DNase Set (DNase, RDD-Puffer und RNase-freies Wasser)	Qiagen GmbH, Hilden
dNTPs (25 nM)	dNTP-Set, GE Healthcare, München
DTT (0,1 M)	Invitrogen, Karlsruhe
Hexanucleotide	Roche, Mannheim
MgCl ₂ (25 mM)	Fermentas, St. Leon-Rot
Natriumacetat (CH ₃ COONa)	Merck, Darmstadt
RNA-sample-loading-Buffer	Sigma Aldrich, Steinheim
RNasin (40 U/µl)	Promega, Mannheim
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
RT-PCR SybrGreen Primers	Metabion, Martinsried
Superscript II	Invitrogen, Karlsruhe
SybrGreen I Nucleic Acid Gel Stain	Fluka, Sigma Aldrich, Steinheim
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe

Short interfering RNA

Negative control siRNA	Ambion / Applied Biosystems, Darmstadt
siRNA MDA5 (Helicard)	Dharmacon, Lafayette, CO, USA
siRNA RIG-1 (DDX58)	Dharmacon, Lafayette, CO, USA

Chemikalien für den Western Blot (Immunoblot)

10 % SDS	BioRad, München
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roche, Mannheim
DTT	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA	Merck, Darmstadt
Enhanced Chemoluminescence ECL	Amersham Pharmacia, Freiburg

Glycerol	Roth, Karlsruhe
HEPES	Sigma Aldrich, Steinheim
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	ICN Biochemicals, Aurora, Ohio, USA
PMSF	Sigma Aldrich, Steinheim
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Fluka, Sigma Aldrich, Steinheim

Zellproliferationsassay (MTS Assay)

CellTiter 96 [®] AQueousOne Solution Cell Proliferation Assay	Promega, Mannheim
--	-------------------

Chemikalien Durchflusszytometrie

Annexin V Binding-Buffer	BD, Heidelberg
FITC-Annexin V	BD, Heidelberg
Maus-Serum Black6	Aus eigener Gewinnung
Propidium-Iodid Staining-Solution	BD, Heidelberg
Ratten-Serum	Aus eigener Gewinnung

Antikörper (jeweils Anti-Maus-Antigen)

Ratte Anti-Maus-IFN- α (RMMA-1)	PBL, Piscataway, NJ, USA
Ratte Anti-Maus-IFN- β (RMMB-1)	PBL, Piscataway, NJ, USA
Ratte Anti-MDA5 (Helicard)	Alexis Biochemicals, San Diego, CA, USA
Ratte Anti-Phospho-IRF-3	Cell Signalling, Danvers, MA, USA
Ratte Anti-RIG-1	Cell Signalling, Danvers, MA, USA
Ratte Anti-TLR3	Abcam, Cambridge, MA, USA
Ratte Anti- β -Aktin	Cell Signalling, Danvers, MA, USA
Ratte FITC-anti-CD106-(VCAM-1)	BioLegend, San Diego, CA, USA
Ratte FITC-anti-CD54-(ICAM-1)	BioLegend, San Diego, CA, USA
Ratte FITC-IgG2a, κ	eBioscience, San Diego, CA, USA
(Isotypkontrolle zu anti-CD106)	
Ratte FITC-IgG2b, κ	eBioscience, San Diego, CA, USA
(Isotypkontrolle zu anti-CD54)	

Rind HRP-anti-Ziege IgG	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
Ziege Anti-ZBP1/DAI	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Ziege HRP-anti-Ratte IgG	Cell Signaling, Danvers, MA, USA

Sonstige Chemikalien

Diethyl-Pyrocyanat (DEPC)	Fluka, Sigma Aldrich
di-Hydrogensulfat (H_2SO_4)	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-Dextran	Sigma Aldrich, Steinheim
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-Phalloidin	Invitrogen, Karlsruhe
Hydrogenchlorid (HCl) 5N	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich, Steinheim
Pikrinsäure (2,4,6-Trinitrophenol)	Sigma Aldrich, Steinheim
Pipes (Piperazin-1,4-ethansulfonsäure)	Boehringer Mannheim, Mannheim
Tween-20	Fluka, Sigma Aldrich, Steinheim

Lösungen

10 x MOPS-Puffer	20,93 g
(3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure)	200 mM Mops
	3,4 g 50 mM Na-Acetat
	10 ml 0,5 M EDTA
	in 500 ml Wasser gelöst, auf pH 7 eingestellt
10 x PBS	80,0 g NaCl
(Phosphate buffered saline)	11,6 g Na_2HPO_4

	2,0 g KH_2PO_4 2,0 g KCl in 1 l doppelt deionisiertes Wasser gelöst, auf pH 7 eingestellt
LSB (Low Salt Buffer)	10 mM Tris 10 mM NaCl 10 mM EDTA Auf pH 7,4 eingestellt
Mastermix für die SybrGreen I real- time RT-PCR, pro 10 ml Volumen:	2 ml 10 x Taq Puffer without detergent 150 μl dNTP 25 mM 4 ml BioStab PCR optimizer 200 μl Bovines Serumalbumin (20 mg/ml) 40 μl SybrGreen I Nucleic Acid Gel Stain 2,4 ml MgCl_2 25 mM 1210 μl H_2O
TBS (Tris Buffered Saline)	24,22 g 200 mM Tris; 80 g 1,37 M NaCl 1 l Millipore-Wasser, auf pH 7,6 eingestellt
TBST (Tris Buffered Saline Tween-20)	TBS + 0,1 % Tween-20

2.1.2 Sequenzen der Oligonukleotid-Primer für die real-time RT-PCR

Gen		Primersequenz
18S	Left	5'-AGGGCCTCACTAAACCATCC-3'
	Right	5'-GCAATTATTCCCCATGAACG-3'
CCL2/MCP-1	Left	5'-CCTGCTGTTCACAGTTGCC-3'
	Right	5'-ATTGGGATCATCTTGCTGGT-3'

CCL5/RANTES	Left	5'-CCACTTCTTCTCTGGGTGG-3'
	Right	5'-GTGCCCACGTCAAGGAGTAT-3'
CXCL10/IP-10	Left	5'-GGCTGGTCACCTTTCAGAAG-3'
	Right	5'-ATGGATGGACAGCAGAGAGC-3'
DAI/ZBP1	Left	5'-TATGACGGACAGACGTGGAA-3'
	Right	5'-TGCTGACAAATAATCGCAGG-3'
IFNB1 (IFN β)	Left	5'-CCCTATGGAGATGACGGAGA-3'
	Right	5'-CCCAGTGCTGGAGAAATTGT-3'
IL6	Left	5'-TGATGCACTTGCAGAAAACA-3'
	Right	5'-ACCAGAGGAAATTTTCAATAGGC-3'
MDA5	Left	5'-GCCTGGAACGTAGACGACAT-3'
	Right	5'-TCATCGAAGCAGCTGACACT-3'
MX1 (p78)	Left	5'-TCTGAGGAGAGCCAGACGAT-3'
	Right	5'-CTCAGGGTGTCGATGAGGTC-3'
RIG-1	Left	5'-CTGCCTCACTCTTCCTCCAG-3'
	Right	5'-TGGCTTCACAAAGTCCACAG-3'
TLR3	Left	5'-ATGATACAGGGATTGCACCC-3'
	Right	5'-ATAGGGACAAAAGTCCCCCA-3'

2.1.3 Sequenzen der short interfering RNA

Zielgen	Sequenz der short interfering RNA (siRNA)
DAI/ZBP1	5'-ACAGUCCAGACAGUCCACAUCAAAU-3'; control, 5'-GGCAACAAGAUGACCAUCCACCUUA-3', 5'-GGAAGACACAGGUACAAGCUCUGAA-3'; control, 5'-GAAGAGCACGAGAUAGCAAUU-3';
MDA5	5'-GAACGUAGACGACAUAUUA-3', 5'-CAACGAAGCCUACAAAUC-3', 5'-CUUGAUGCCUUUACCAUUA-3', 5'-GGGAGAUUGUUA AUGAUUU-3';
RIG-1 (DDX58)	5'-CAAGAAGAGUACCACUAAAU-3', 5'-GUUAGAGGAACACAGAUUAUU-3', 5'-GUUCGAGAUUCCAGUCAUUAUU-3', 5'-GAAGAGCACGAGAUAGCAAUU-3';

2.1.4 Murine glomeruläre Endothelzellen (GEnC)

Die für Zellkulturstudien in dieser Arbeit verwendeten glomerulären Endothelzellen sind murine glomeruläre Endothelzellen, deren Isolierung aus der *ts A58 Immortomaus* und Charakterisierung bereits beschrieben wurde [4] und die uns freundlicherweise von Dr. Nese Akis zur Verfügung gestellt wurden. Nach der Gewinnung einzelner Glomeruli selektierten Akis et al. daraus mittels magnetischer Beads und Antikörper gegen das endotheliale Oberflächenmolekül CD31 (PECAM-1) CD31-positive Zellen. Die erhaltenen Zellklone wurden auf Positivität für weitere endothelspezifische Marker wie CD54 (ICAM-1), CD106 (VCAM-1), CD62E (E-Selectin) sowie auf ihre Fähigkeit, acetyliertes LDL aufzunehmen, untersucht. All diese Bedingungen waren bei gleichzeitig negativer Testung für epitheliale oder mesangiale Zellmarker gegeben [4]. Morphologisch erscheinen die glomerulären Endothelzellen als verhältnismäßig kleine polygonale Zellen, die im konfluierenden Stadium ein endotheltypisches kopfsteinpflasterähnliches Muster ausbilden [167] (Abbildung 12).

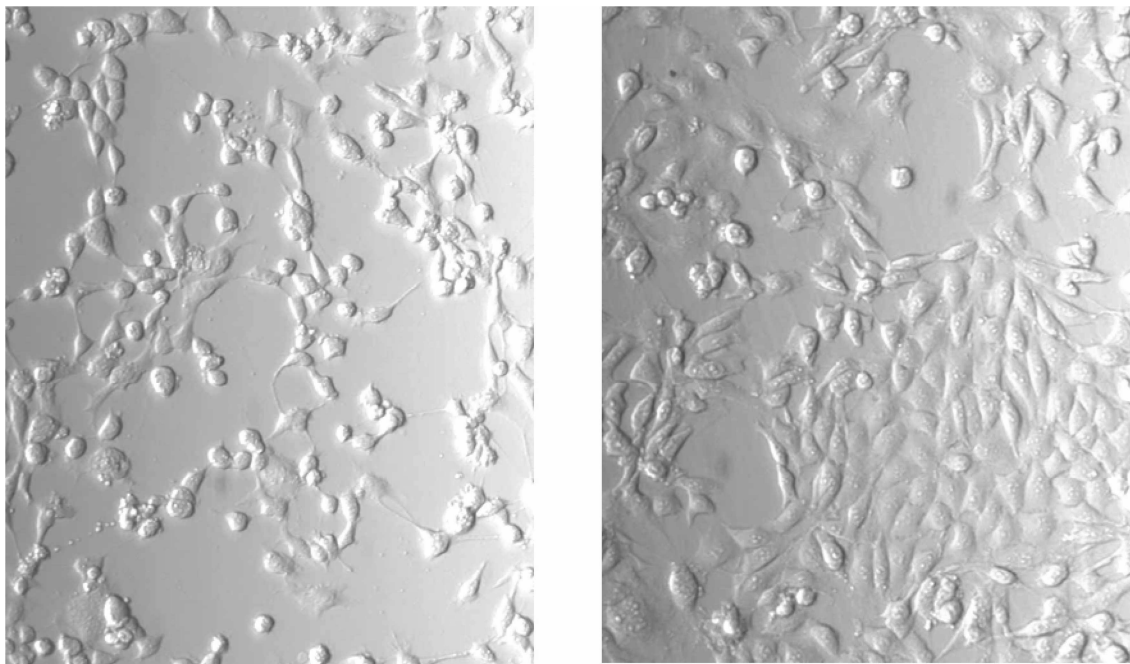


Abbildung 12: Lichtmikroskopische Aufnahme kultivierter muriner glomerulärer Endothelzellen (GEnC). Links befinden sich die Zellen im nichtkonfluierenden Stadium. **Rechts** konfluieren sie bereits und bilden ein für sie charakteristisches Muster, das an Kopfsteinpflaster erinnert.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur und Stimulationsexperimente

Kulturbedingungen

Die glomerulären Endothelzellen wurden unter Standardbedingungen (bei 37 °C im Inkubator mit 5 % CO₂) in RPMI 1640-Medium unter Zusatz von 10 % FCS und 1 % PS (100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) in Petrischalen mit 10 cm Durchmesser kultiviert. 24 Stunden vor Durchführung von Experimenten und währenddessen wurde RPMI 1640-Medium mit 2 % FCS ohne PS verwendet. Um die Zellen zu passagieren, wurden sie bei nahezu 100%iger Konfluenz mit PBS gewaschen und mit 1,5 mM EDTA (in PBS) für ca. zehn Minuten im Brutschrank inkubiert. Dadurch lösten sich die Zellen von der Petrischale ab, sodass die Zellsuspension unter Zugabe von Medium mit FCS in ein Röhrchen pipettiert und in der Zentrifuge bei 1000 Umdrehungen pro Minute für drei Minuten zentrifugiert wurde. Anschließend wurden der Überstand abgesaugt, die Zellen in vorgewärmtem Medium resuspendiert und im Verhältnis 1:5 oder 1:10 auf neue Petrischalen passagiert oder für experimentelle Ansätze entsprechend auf 6-well-, 12-well- oder 24-well-Platten gegeben.

Kryokonservierung und Auftauen der Zellen

Um die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren zu konservieren, wurden sie wie zur Zellpassage mit PBS gewaschen, mittels 1,5 mM EDTA (in PBS) von der Zellkulturschale gelöst und zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 2 ml Lösung, bestehend aus FCS mit 10 % DMSO, resuspendiert. In je ein Kryoröhrchen wurde schnellstmöglich 1 ml dieser Suspension überführt und zunächst für 48 Stunden bei -80 °C aufbewahrt, anschließend im Flüssigstickstoff deponiert. Für den Auftauvorgang wurden die im Flüssigstickstoff gelagerten Kryoröhrchen bei Raumtemperatur aufgetaut. Die enthaltene Zellsuspension wurde mit etwa 30 ml PBS verdünnt, um toxische Effekte des DMSO zu minimieren. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei 1000 Umdrehungen pro Minute und Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 12 ml RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS und 1 % PS (100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) resuspendiert und in Petrischalen mit 10 cm Durchmesser kultiviert.

Zellzählung

Für die Zellzählung wurde das Pellet nach der Zentrifugation in 1 ml Medium resuspendiert und davon 50 µl mit 50 µl PBS gemischt. Hiervon wurden erneut 50 µl entnommen und zu 50 µl Trypanplau addiert. Die Suspension wurde in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und die hellen (vitalen) Zellen von acht Großquadraten mäanderförmig ausgezählt. Entsprechend der folgenden Formel wurde dann die Zellzahl errechnet:

$$\text{Zellzahl pro ml} = (\text{Gezählte Zellen} / 8) * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^4$$

Stimulationsexperimente und Transfektion mit kationischen Lipiden

Vor Stimulationsexperimenten mit den glomerulären Endothelzellen wurden die Zellen für 24 Stunden in RPMI-Medium mit 2 % FCS ohne Penicillin / Streptomycin) kultiviert, bis sie zu 70 bis 80 % konfluent waren.

Um Überstand für ELISAs zu gewinnen, wurden die Zellen auf 12-well-Platten mit 1,0 ml Medium kultiviert, für die Gewinnung von RNA für die real-time RT-PCR und von Zellen für die Durchführung von Durchflusszytometrie jeweils auf 6-well-Platten mit 2 ml Medium. Kontaminationen mit LPS wurden minimiert, indem die Zellen jeweils eine halbe Stunde vor der Stimulation mit Polymyxin B inkubiert wurden.

Für die Transfektion der Zellen wurde zunächst die gewünschte Menge Nukleinsäure (poly I:C-RNA, poly dA/dT-DNA oder siRNA) in 25 µl Opti-MEM gegeben und gemischt. In einem anderen Gefäß wurden die 1,5-fache Menge Lipofectamine™ 2000 mit 25 µl Opti-MEM vermischt, anschließend beide Inhalte zusammengeführt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Lipofectamine® als kationisches Lipid ermöglicht den Übertritt der Nukleinsäuren in das Zytosol. Der Mechanismus wird als Lipofektion (oder liposomale Transfektion) bezeichnet und basiert auf der Eigenschaft von Liposomen, sich mit der Zellmembran zu verschmelzen, weil sie ebenfalls über eine Phospholipid-Doppelschicht verfügen. Dadurch können diese liposomalen Vesikel ihren Inhalt in den Intrazellulärraum freigeben. Die positive (kationische) Ladung der Lipide sorgt dabei für die Komplexbildung mit den negativ geladenen Nukleinsäuren [35].

MyD88-Inhibition

Um eine funktionelle Inhibierung von MyD88 zu erreichen, wurden die glomerulären Endothelzellen wie oben beschrieben kultiviert und zunächst für 24 Stunden jeweils mit dem Inhibitorpeptid oder dem Kontrollpeptid in einer Konzentration von 100 µmol/l inkubiert. Anschließend wurde das Zellmedium nicht ausgetauscht und die Zellen mit poly I:C-RNA oder poly dA/dT-DNA stimuliert, jeweils im Komplex mit kationischen Lipiden. Als Positivkontrolle diente der TLR2-Ligand Pam3CSK4.

MyD88 ist ein Adapterprotein, welches am TLR-Signalweg beteiligt ist und dessen Homodimerisierung dabei den wichtigen Reaktionsschritt darstellt. Dieser wird durch das Inhibitorpeptid unterbunden, welches eine Sequenz der MyD88-TIR-Homodimerisations-Domäne enthält, die an ein MyD88-Monomer bindet [95].

Gen-Knockdown mittels RNA-Interferenz (siRNA)

RNA-Interferenz RNAi bezeichnet den (natürlichen) regulatorischen Vorgang, die Genexpression bestimmter Gene in eukaryontischen Zellen zu beeinflussen. Unterschiedliche Typen von RNA können hierbei beteiligt sein, in dieser Arbeit wurde *short interfering RNA* (siRNA) verwendet. Diese nichtkodierende RNA führt zum Abbau der transkribierten mRNA. Auf diese Weise kann ein Gen post-transkriptionell funktionell blockiert werden, da es aufgrund der verminderten mRNA zur reduzierten Translation und Proteinsynthese kommt. *Short interfering RNA* sind kurze, 18-25 Nukleotide lange doppelsträngige RNA-Moleküle, die molekularbiologisch in die Zielzelle transfiziert werden. Unter Beteiligung der Helikase *dicer* und des sog. *RNA-induced silencing complex* (RISC) bindet der Anti-Sense-Strang der siRNA an die korrespondierende Ziel-mRNA und induziert deren Degradierung [24, 59, 140].

Die glomerulären Endothelzellen wurden mit einer Zellzahl von 10^5 Zellen / ml in 12-well-Schalen kultiviert und bei einer Konfluenz von etwa 30 % und erneut bei 60 % mit 40 nM der siRNA (bzw. Negativkontroll-siRNA) mittels kationischem Lipid (Lipofectamine™ 2000) transfiziert. 24 Stunden später wurde mit der entsprechenden Nukleinsäure stimuliert: beim Knockdown von RIG-1 und MDA5 mit 10 µg/ml poly I:C-RNA, beim Knockdown von DAI/ZBP1 mit 6 µg/ml B-DNA, jeweils vorher mit kationischem Lipid komplexiert.

Die Wirksamkeit des Gen-Knockdowns wurde nach sechs Stunden mittels real-time RT-PCR

überprüft. Ab einer Senkung der mRNA-Expression des jeweiligen Zielgens von mindestens 70 % wurde der Gen-Knockdown als erfolgreich gewertet.

Permeabilität von Fluorescein-Isothiocyanat-(FITC)-Albumin *in vitro*

Glomeruläre Endothelzellen weisen eine gewisse basale Permeabilität für lösliche Komponenten auf, darunter auch für Albumin [26]. Ob sie nach Applikation viraler Nukleinsäuren ihre Durchlässigkeit steigern, wurde mit Einsätzen aus Polyethylenterephthalat (PET) überprüft, die in die Zellkulturschalen eingelegt wurden, sodass in der Zellkulturschale zwei Kompartimente entstanden. Auf der PET-Membran mit Poren von 1 µm Größe wurden die glomerulären Endothelzellen in einer Monoschicht kultiviert. In das obere Kompartiment wurde mit FITC markiertes bovines Serumalbumin (BSA) gegeben und die Zellen wurden mit poly I:C-RNA- und B-DNA-Komplexen stimuliert. In zeitlichen Abständen von sechs, 24 und 48 Stunden wurde dann die Konzentration des durch die Zellschicht in das untere Kompartiment übergetretenen FITC-Albumins bestimmt, indem daraus Medium entnommen und nach Exzitation mit Licht der Wellenlänge 485 nm das emittierte Licht der Wellenlänge 535 nm gemessen wurde. Anhand einer Verdünnungsreihe bekannter BSA-Konzentrationen konnte dann die jeweilige Albuminkonzentration errechnet werden.

2.2.2 Konfokalmikroskopie

Die Konfokalmikroskopie stellt ein spezielles Verfahren der Fluoreszenzmikroskopie dar. Im Unterschied zur konventionellen lichtmikroskopisch basierten Fluoreszenzmikroskopie kann der Fokus mittels Lasermikroskop auf nur jeweils sehr dünne Schichten eines Präparats gelegt werden. Dadurch erhält man kein übereinandergelagertes Bild, wie es im Lichtmikroskop üblich ist, sondern eine nahezu einschichtige Aufnahme eines Präparats.

Die glomerulären Endothelzellen wurden mit 5'-rhodaminmarkierter B-DNA (jeweils alleine oder im kationischen Lipidkomplex) inkubiert und nach zwei Stunden mit Paraformaldehyd-Lösung (2 %), 10 mM Pipes und Pikrinsäure (15 %) bei pH 6,0 fixiert. Anschließend wurden sie über Nacht mit FITC-markiertem Phalloidin (Verd. 1:200) inkubiert und mit dem LSDM510 Lasermikroskop untersucht. Rhodaminmarkierte B-DNA erscheint dem Betrachter im konfokalmikroskopischen Bild rot, FITC-Phalloidin grün.

2.2.3 ELISA

Unter einem ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) versteht man ein immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion beruht [30, 31]. Das Prinzip basiert auf Antikörpern, die spezifisch an eine gesuchte Substanz (Antigen) binden. Mittels eines an den Antikörper gekoppelten Enzyms wird dann eine Farbreaktion katalysiert, mithilfe derer das Vorliegen der nachzuweisenden Substanz quantitativ ermittelt werden kann.

Es existieren diverse Varianten des ELISA. Beim „Sandwich-ELISA“ kommen zwei Antikörper zum Einsatz, die spezifisch an jeweils unterschiedlichen Angriffspunkten an das Antigen binden. Der erste Antikörper (*coating*-Antikörper) befindet sich an einem festen Gegenstand, hier auf einer 96-well-Mikrotiterplatte. Hierauf wird die zu untersuchende Substanz gegeben, sodass das Antigen vom ersten Antikörper gebunden wird. Ein Waschvorgang entfernt alle ungebundenen Probenbestandteile. Nun erfolgt die Zugabe des zweiten Antikörpers (*detection*-Antikörper), an dessen Ende sich ein Enzym, hier Merrettichperoxidase (HRP, engl. *horseradish peroxidase*), befindet. Der zweite Antikörper detektiert ein anderes Epitop am Antigen, sodass ein an ein Sandwich erinnernder Komplex entsteht, bestehend aus erstem Antikörper, Antigen und dem zweiten Antikörper. Nach einem weiteren Waschvorgang kann ein Chromogen hinzugegeben werden, welches vom gekoppelten Enzym zu einem Reaktionsprodukt umgesetzt wird. In diesem Fall ist das Substrat das Gemisch aus TMB, beendet wird die Farbreaktion durch Zugabe von Schwefelsäure. Dieser Farbumschlag wird photometrisch anhand einer Standardreihe bekannter Antigenkonzentrationen quantifiziert und ist proportional zur Antigenkonzentration [158]. Alle in dieser Arbeit erwähnten ELISAs wurden gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt.

2.2.4 RNA-Analyse

Die RNA aus den glomerulären Endothelzellen wurde mittels RNeasy-Kit von Qiagen gewonnen. Alle Arbeitsschritte wurden an einem RNase-freien Arbeitsplatz auf Eis durchgeführt, sämtliche Eppendorf-Gefäße vorher mit DEPC behandelt, um RNAsen weitgehend zu inaktivieren.

RNA-Isolation

Zuerst wurde das Medium von den Zellkulturplatten abgezogen und die Zellen mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit RLT-Lyse-Puffer lysiert, der im Verhältnis von 100:1 mit β -Mercapto-Ethanol gemischt worden war. Hiervon wurden 350 μ l auf die Zellen gegeben und diese mit einem Zellschaber abgekratzt, das Lysat mit einer Pipette mehrmals aufgesaugt und wieder zurückgespült, um es danach in einem Eppendorf-Gefäß bei -20 °C einzufrieren oder direkt mit der RNA-Isolation fortzufahren.

Die Zelllysate wurden gemäß des Protokolls des RNeasy Kits im Wasserbad auf 37 °C erwärmt und im Verhältnis 1:1 vorsichtig mit 70%igem Ethanol gemischt. Anschließend wurden die Proben auf die Filtrier-Säulen pipettiert und für 15 Sekunden bei 11.200 Umdrehungen / Minute zentrifugiert, sodass die RNA auf der Membran haften blieb, während das Filtrat verworfen wurde. Nun wurden 350 μ l RW1-Puffer hinzugegeben, um verbleibendes Ethanol auszuwaschen, und für 15 Sekunden bei 11.200 Umdrehungen/Minute zentrifugiert, das Filtrat wiederum verworfen. Jetzt wurde das DNase-Puffer-Gemisch hergestellt: Dazu wurde das DNase-Pulver in 550 μ l RNase-freiem Wasser aufgelöst. Pro Probe wurden 10 μ l der DNase mit 70 μ l RDD-Puffer gemischt und die 80 μ l DNase-Puffer-Gemisch mittig auf die Säulen gegeben. Nach 15-minütiger Inkubation wurde erneut mit 350 μ l RW1-Puffer wie oben beschrieben zentrifugiert und die Säulen in neue Eppendorf-Gefäße umgesetzt. 500 μ l RPE-Puffer wurden hinzupipettiert, für 15 Sekunden bei 11.200 Umdrehungen / Minute zentrifugiert, das Filtrat verworfen und nochmals mit 500 μ l RPE-Puffer für 2 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden die Säulen in neuen Eppendorf-Gefäßen für 1 Minute bei 13.200 Umdrehungen / Minute trocken zentrifugiert. Um die RNA von der Membran zu lösen, wurden die Säulen in neue Eppendorf-Gefäße eingesetzt und nach Zugabe von 33 μ l RNase-freiem Wasser für 1 Minute bei 11.200 Umdrehungen / Minute zentrifugiert, sodass die RNA nun bei -80 °C gelagert werden konnte.

Messung der optischen Dichte und Gelelektrophorese der isolierten RNA

Direkt anschließend an die RNA-Isolation wurde die optische Dichte der RNA-Lösung gemessen, um die jeweilig isolierte RNA-Menge zu errechnen. Aus den Proben wurden 2 μ l RNA-Lösung entnommen und mit 98 μ l RNase-freiem Wasser 1:50 verdünnt. Diese Lösung wurde in eine Küvette pipettiert und im Photometer die Werte für 260 nm, 280 nm und das

Verhältnis aus 260 nm / 280 nm bestimmt. Diese Relation sollte optimalerweise zwischen 1,7 und 2,2 liegen. Ist sie zu niedrig, sind die Proben wahrscheinlich mit Protein kontaminiert; ist das Verhältnis zu hoch, mit DNA. Für die spätere Umschreibung der RNA in cDNA sind 2 µg RNA notwendig. Die Konzentration der RNA in der Lösung lässt sich wie folgt errechnen: $c \text{ (µg/ml)} = \text{Extinktion bei 260 nm} * \text{Verdünnungsfaktor} * 40$.

Da die Messung der optischen Dichte keine völlige Gewissheit über die Reinheit der isolierten RNA zulässt, wurde die gewonnene RNA nach der Isolation einer Gel-Elektrophorese zugeführt. Hierzu wurden 2 µl der RNA-Probe mit 5 µl RNA-Ladepuffer gemischt, zehn Minuten bei 37 °C im Thermomixer inkubiert und danach auf das Agarosegel (0,75 g Agarose-Pulver und 50 ml Mops-Puffer) aufgetragen. Für 20 Minuten wurden 130 V Spannung angelegt und abschließend in der Dunkelkammer die Banden angesehen. Reine Proben ohne Kontamination enthielten deutlich voneinander abgrenzbare Banden.

cDNA-Synthese (reverse Transkription)

Für die cDNA-Synthese wurden pro zu untersuchender Probe zwei Reagenzmischungen angesetzt: einmal zur cDNA-Synthese als *cDNA-RT+* (mit reverser Transkriptase) sowie einmal als Negativkontrolle als *cDNA-RT-* (ohne reverse Transkriptase). Zu jeweils 2 µg RNA in 30 µl RNase-freiem Wasser wurden 15 µl Mastermix addiert, welcher aus folgenden Reagenzien bestand: 8 µl 5xPuffer, 0,8 µl 25 mM dNTP, 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl RNasin, 0,5 µl 15 µg/ml Linear-Acrylamid, 0,43 µl Hexanucleotide. Für die Gruppe *cDNA-RT+* wurden 0,86 µl reverse Transkriptase (Superscript II) hinzugefügt, für die Gruppe *cDNA-RT-* 0,86 µl RNase-freies Wasser. Die resultierende Mischung aus RNA und Mastermix wurde im Thermomixer bei 42 °C eine Stunde lang langsam geschüttelt, die produzierte cDNA bei -20 °C gelagert.

Quantitative real-time RT-PCR

Das Verfahren der quantitativen real-time RT-PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren und erlaubt eine Quantifizierung der gewonnenen DNA, die während einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) synthetisiert wird. In dieser Arbeit basierte das Verfahren auf Fluoreszenz-Messungen des Farbstoffs SYBR Green I, welcher mit doppelsträngiger

DNA (dsDNA) interkaliert. In gelöstem Zustand emittiert SYBR Green I nur eine geringe Fluoreszenz, nach Bindung an doppelsträngige DNA jedoch ein starkes Fluoreszenzsignal, sodass mit zunehmender Anzahl synthetisierter DNA-Moleküle die Fluoreszenz entsprechend ansteigt. Da SYBR Green I relativ unspezifisch an gebildete PCR-Produkte bindet, wurde bei jeder durchgeführten Real-time RT-PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Fragmentlänge der DNA zu ermitteln und damit die Spezifität zu bestimmen. Bei der Schmelzkurvenanalyse wird die Temperatur langsam stetig erhöht, um die DNA aufzuschmelzen. Jedes DNA-Doppelstrangfragment denaturiert nun bei einer spezifischen Temperatur in zwei Einzelstrang-DNA-Moleküle und gibt dadurch den gebundenen Farbstoff SYBR Green I wieder frei, woraus eine Abnahme der Fluoreszenzintensität resultiert. Somit kann man anhand der Schmelzkurve zwischen einzelnen DNA-Fragmenten unterscheiden [11].

Die quantitative real-time RT-PCR wurde im Roche Lightcycler[®] 480 Real-Time PCR System durchgeführt. Dazu wurden die hergestellte *cDNA-RT+* bzw. die negativen Kontrollproben *cDNA-RT-* im Verhältnis 1:10 mit DEPC-behandeltem Wasser (zur Inaktivierung von Ribonukleasen) verdünnt. In jedes well einer 96-well-Mikrotiterplatte wurden 10 µl des Mastermixes für die SybrGreen I real-time RT-PCR (siehe Liste der Lösungen, Kapitel 2.1.1) zusammen mit 0,6 µl des jeweiligen Forward Primers, 0,6 µl des jeweiligen Reverse Primers, 0,16 µl der Taq Polymerase, 2 µl der 1:10 verdünnten *cDNA-RT+* bzw. *cDNA-RT-* und 6,64 µl DEPC-behandelten Wassers pipettiert, sodass ein Volumen von 20 µl pro well vorlag. Die Platte wurde anschließend verplombt, bei 4 °C für zwei Minuten bei 280 x g zentrifugiert und die quantitative real-time PCR im Roche Lightcycler[®] 480 gestartet. Folgende Parameter wurden hierbei gewählt: die erste Inkubation erfolgte für 5 Minuten (der Aktivität der Taq-Polymerase entsprechend) bei 95 °C. Anschließend folgten 40 Zyklen Amplifikation, jeweils zu 15 Sekunden bei 95 °C und zu 45 Sekunden bei 60 °C. Danach wurde die Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, indem für 5 Sekunden bei 95 °C inkubiert wurde, danach die Temperatur von 65 °C konstant auf 95 °C erhöht wurde. Abschließend wurde für 30 Sekunden bei 40 °C gekühlt. Jeweils auf derselben Platte erfolgte eine Analyse für das Housekeeping-Gen 18S rRNA. Nur Durchläufe, die ein negatives Ergebnis für die Negativkontrollen *cDNA-RT-* zeigten, wurden zur Bewertung herangezogen.

2.2.5 Western Blot

Als Western Blot bezeichnet man die Übertragung von Proteinen von einem Elektrophorese-Gel auf eine Membran, um diese Proteine dann mit diversen Reaktionen nachweisen zu können. Der Name geht auf Edwin Southern zurück, der 1975 erstmals das Blotten von DNA („Southern Blot“) beschrieben hat [17], analog dazu heißt das Verfahren der Proteinanalyse „Western Blot“. In der vorliegenden Arbeit wurde der Western Blot mittels Immundetektion durchgeführt („Immunoblot“). Das zu analysierende Proteingemisch wird zuerst mittels Gel-Elektrophorese aufgetrennt und die Proteine vom Gel auf eine Membran übertragen. Spezifische Primär-Antikörper werden dann auf die Membran gegeben, die an das zu untersuchende Protein binden. Anschließend erfolgen Waschvorgänge und die Addition eines Sekundär-Antikörpers, welcher an das Fc-Fragment des ersten Antikörpers bindet. Ein an den Zweitantikörper gekoppeltes Enzym (hier Meerrettichperoxidase, HRP, engl. *horseradish peroxidase*) katalysiert eine Chemolumineszenzreaktion, mit der schließlich das gesuchte Protein detektiert und sichtbar gemacht wird. Anhand der Stärke der Proteinbande kann halbquantitativ eine Aussage über die Proteinmenge getroffen werden.

Die glomerulären Endothelzellen wurden mit einem Lyse-Puffer lysiert, der aus 200 µl 1M HEPES, 2 ml 100 % Glycerin, 15 µl 1M MgCl₂, 10 µl 1M DTT, 100 µl 10 % Triton X-100, 20 µl Natriumvanadat, 1 ml Natriumfluorid, 100 µl Protease-Inhibitor (Phenylmethylsulfonylfluorid = PMSF) und 6,5 ml LSB bestand. Anschließend wurden die Zellen mit Ultraschall behandelt, um die Zellmembranen für die Proteine durchlässig zu machen. Nach Zentrifugation wurden 25-50 µg des Lysats in einer SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) aufgetrennt und auf eine Immobilon-P-Membran übertragen. Die Blots wurden für zwei Stunden in Magermilchpulver (in TBS mit 0,1 % Tween-20) oder je nach später verwendetem Antikörper in 2%igem BSA geblockt und über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Proben dreimal mit TBST gewaschen und bei Raumtemperatur für eine Stunde mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST wurden die Blots mit Chemolumineszenz entwickelt.

2.2.6 Zellproliferation

Mittels des *CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* lässt sich bewerten, inwieweit sich die Proliferation von Zellen in Zellkultur auf bestimmte Stimuli hin ändert. Bei dieser Methode wird das Tetrazoliumsalz MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) zu den Zellen gegeben, welches mithilfe der in metabolisch aktiven Zellen entstehenden Reduktionsäquivalente NADH und NADPH zu Formazan umgesetzt wird. Aufgrund des sich daraus ergebenden Farbumschlags von gelb nach rot kann die Menge entstandenen Formazans im Spektrophotometer (ELISA-Lesegerät) durch Messung der Absorption bei 492 nm bestimmt werden. Sie ist direkt proportional zur Anzahl lebender Zellen bzw. zur Zahl metabolisch aktiver Zellen. Für dieses Assay wurden 20.000 Zellen pro well in 96-well-Platten kultiviert. Nach Ligandenstimulation wurden 20 µl der *One Stop Solution* hinzugegeben und nach drei Stunden die Absorption bei 492 nm gemessen.

2.2.7 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (häufig synonym mit dem geschützten Kürzel „FACS“ für *fluorescence-activated cell sorting* bezeichnet) ist eine Technik zur Zählung und zur genaueren Untersuchung mikroskopischer Partikel, wie z.B. biologischer Zellen. Dabei passieren diese in einem Flüssigkeitsstrom im Detektionsapparat einzeln hintereinander einen Laserstrahl, welcher von den Zellen unterschiedlich gestreut wird. In Reihe liegende Detektoren registrieren dessen Vorwärtsstreuung (*Forward Scatter*, „FSC“), lotrecht angeordnete Detektoren die Seitwärtsstreuung (*Side Scatter*, „SSC“), außerdem können fluoreszierende Farbstoffe erkannt werden. Die Vorwärtsstreuung FSC korreliert mit dem Zellvolumen, während das Seitwärtsstreulicht SSC von der inneren Beschaffenheit des Partikels abhängt, d.h. von der Granularität der Zelle, der Struktur ihres Zellkerns und der Menge und Art ihrer Vesikel. Auf diese Art und Weise lassen sich Zellen bereits nativ ohne zusätzliche Färbung voneinander unterscheiden [32].

Fluoreszenzfarbstoffe kann man sich im Durchflusszytometer zusätzlich zu Hilfe nehmen, um detailliertere Aufschlüsse über die zu untersuchenden Zellen zu erhalten. Beispielsweise können Farbstoffe eingesetzt werden, die mit der DNA der Zelle interkalieren (z.B. Propidiumiodid), oder markierte Antikörper dazu verwendet werden, durch Bindung an

bestimmte Oberflächenmoleküle Zellen für das Durchflusszytometer sichtbar zu machen. Dadurch ist es möglich, den gleichen Zelltypus aufgrund der Bindung unterschiedlicher Fluoreszenzfarben in spezielle Populationen einzuteilen. Details hierzu siehe in den beiden folgenden Kapitelpunkten. Die durchflusszytometrische Analyse wurde mit *FacsCalibur*TM und der *CellQuest Software* von BD Pharmingen durchgeführt.

Beurteilung der Apoptose

Um die Zahl apoptotischer Zellen zu bestimmen, kamen Durchflusszytometrie und das *FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I* zum Einsatz. Diese Methode basiert auf der calciumabhängigen Eigenschaft des Proteins Annexin V, hochaffin an das Membranphospholipid Phosphatidylserin (PS) zu binden. Bei früh-apoptotischen Zellen kommt es zu einer Translokation des Phosphatidylserins von der zytosolischen Membranseite auf die Außenseite, sodass FITC-konjugiertes Annexin V daran binden kann und die damit markierten Zellen als apoptotische Zellen identifiziert werden können. Da in der Schlussphase des Zelltodes die Membranstabilität abnimmt und somit auch tote Zellen mit FITC-Annexin V gefärbt werden können, wird eine weitere Substanz benötigt, die die Vitalität der Zelle kennzeichnet: Propidiumiodid (PI). Propidiumiodid ist ein Farbstoff, der mit DNA interkaliert, aber nur die Membran von beschädigten oder toten Zellen durchdringt [81, 100, 162]. Auf diese Weise können lebende Zellen (doppelt negativ für FITC-Annexin V und PI) von früh-apoptotischen (positiv für FITC-Annexin V und negativ für PI) und spät-apoptischen, toten Zellen (doppelt positiv für FITC-Annexin V und PI) unterschieden werden. Da auch nekrotische Zellen doppelt positiv gefärbt werden, ist es hierbei wichtig, die unterschiedlichen Phasen von doppelt negativ über FITC-Annexin-V-positiv und PI-negativ bis hin zu doppelt positiv zu durchlaufen, um den Vorgang der Apoptose zu verifizieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden die glomerulären Endothelzellen nach Stimulation in der 6-well-Zellkulturschale mit PBS gewaschen und mit einem Zellschaber vorsichtig eingesammelt. Nach nochmaligem Waschen mit PBS wurden sie in 100 µl calciumhaltigem Bindepuffer resuspendiert und auf eine maximale Zellkonzentration von 10^6 Zellen/ml eingestellt. 200 µl dieser Suspension ($= 2 \cdot 10^5$ Zellen) wurden in ein FACS-Glasröhrchen überführt, mit 5 µl FITC-Annexin V versetzt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 5 µl Propidiumiodid und 400 µl Bindepuffer

hinzugegeben und die Proben in der Durchflusszytometrie analysiert. Als Kontrollen dienten ungefärbte glomeruläre Endothelzellen und jeweils nur mit FITC-Annexin V oder Propidiumiodid gefärbte Zellen. Je Probe wurden 30.000 Zellen im Durchflusszytometer erfasst.

Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 *in vitro*

Die Expression der Membranproteine ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule-1*, CD54) und VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*, CD106) auf glomerulären Endothelzellen *in vitro* wurde mit dem Verfahren der Durchflusszytometrie quantifiziert. Nach 24-stündiger Stimulation mit den zu untersuchenden Nukleinsäuren oder mit Endotoxin (Lipopolysaccharid, LPS) als bekanntem Endothelaktivator wurden die glomerulären Endothelzellen vorsichtig mit einem Zellschaber von der Zellkulturschale abgekratzt, eingesammelt, 5 Minuten lang bei 2.500 Umdrehungen / Minute zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 190 µl kaltem PBS resuspendiert. Hierzu wurden jeweils 5 µl Maus- und Rattenserum gegeben, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend 1 µl des entsprechenden farbstoffmarkierten Antikörpers (FITC-anti-CD54 oder FITC-anti-CD106) addiert und 45 Minuten im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, zentrifugiert, der Überstand abgezogen, erneut in 400 µl PBS resuspendiert und in ein FACS-Glasröhrchen überführt. Pro Probe wurden nun 30.000 Zellen im Durchflusszytometer erfasst und auf ihr Signal für den Farbstoff FITC hin analysiert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die lediglich mit der Isotypkontrolle des Antikörpers inkubiert worden waren, was die unspezifische Antikörperbindung widerspiegelt.

2.2.8 Intravitalmikroskopische Endothelstudien am M. cremaster *in vivo*

Die intravitalmikroskopischen Analysen zur Transmigration der Leukozyten und Endothelpermeabilität wurden freundlicherweise in Zusammenarbeit mit der Forschungsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. vet. Dr. med. habil. Fritz Krombach des Walter-Brendel-Zentrums für Experimentelle Medizin am Standort Großhadern von Herrn Dr. med. Christoph Reichel durchgeführt. Ihnen sei an dieser Stelle nochmals besonders gedankt. Die Verfahren wurden analog zu früheren Studien durchgeführt [126, 127].

Sechs Wochen alten männlichen C57BL/6-Mäusen (Charles River, Sulzfeld) wurde intraskrotal PBS, kationische Lipide (CL) oder Komplexe aus 10 µg B-DNA (poly dA/dT-DNA) und kationischen Lipiden (B-DNA/CL) injiziert. Pro Gruppe wurden vier Mäuse verwendet, einige Mäuse erhielten zudem fünf Minuten vor der intraskrotalen Applikation der B-DNA/CL-Komplexe intravenös 100 µg des anti-CD54/ICAM-1 Antikörpers oder der entsprechenden IgG-Isotypenkontrolle. Nach sechs Stunden wurden die intravitalmikroskopischen Videoaufnahmen an postkapillären Venolen im Musculus cremaster durchgeführt und die Anzahl rollender Leukozyten, fest adhärenter Leukozyten und transendothelial migrierter Leukozyten bestimmt

Die Bilder wurden mit Wasserimmersionslinsen gewonnen (20x/Numerische Apertur 0.5 und 40x/NA 0.8). Um die Geschwindigkeit des Blutflusses zu messen, wurden grünfluoreszierende Mikrosphären (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) über einen arteriellen Katheter injiziert und deren Fluss durch die zu untersuchenden Gefäße mittels eines FITC Filterblocks unter stroboskopischer Illumination mit Expositionszeit 1 ms, Zykluszeit 10 ms, Wellenlänge 488 nm ermittelt. Die quantitative Analyse der Leukozytenmigration erfolgte mit Cap-Image Software (Dr. Zeintl, Heidelberg). Leukozyten wurden dann als fest adhärenter Leukozyten gewertet, wenn sie länger als 30 Sekunden am Endothel hafteten. Ihre Zahlenangabe erfolgte pro 100 µm Gefäßlänge. Transmigrierte Zellen wurden im Bereich von jeweils 75 µm zu jeder Seite eines Gefäßes gezählt, ebenfalls auf 100 µm Länge.

Ebenfalls wurde die transendotheliale Dextran-Permeabilität *in vivo* ermittelt, analog zum von Reichel et al. beschriebenen Vorgehen [127]. FITC-markiertes Dextran (5 mg in 0,1 ml Salzlösung, M_r 150.000) wurde sechs Stunden nach der B-DNA-Injektion intraarteriell infundiert. 30 Minuten nach der Dextran-Injektion wurden jeweils fünf postkapillären Gefäßsegmente und das umgebende perivaskuläre Gewebe mit Licht der Wellenlänge 488 nm angeregt und das emittierte Licht bei 515 nm mit einer CCD-Kamera (Sensicam, PCO, Kelheim) gemessen. Die mittleren Werte der Fluoreszenz-Intensität wurden per digitaler Bildanalyse (TILLvisION 4.0, TILL Photonics) in sechs zufällig ausgewählten Regionen von 50 µm² Größe in 50 µm Entfernung der postkapillären Venole berechnet und entsprechend ein mittlerer Grauwert ermittelt.

2.2.9 Statistische Auswertung

Die präsentierten Werte sind als Mittelwerte dargestellt. Fehlerbalken kennzeichnen den *standard error of the mean* (SEM), welcher den Quotienten aus Standardabweichung und Quadratwurzel aus der Anzahl der Proben widerspiegelt. Mittels zweiseitig gepaartem *Student's t-test* wurden einzelne Gruppen verglichen, mittels ANOVA (*analysis of variance*) mit anschließender Bonferroni-Korrektur mehrere Gruppen. Ab einem p-Wert kleiner als 0,05 wurde statistische Signifikanz angenommen. Die Bezeichnung eines signifikanten Unterschieds im Fließtext ist einer statistischen Signifikanz gleichzusetzen.

Ergebnisse

3 Ergebnisse

3.1 Pathogenerkennungsrezeptoren glomerulärer Endothelzellen

Erste Voraussetzung für die Aktivierung glomerulärer Endothelzellen durch Nukleinsäuren ist, dass sie über die von dendritischen Zellen bekannten Rezeptoren der RNA- und DNA-Erkennung verfügen. Hinsichtlich der Expression von Toll-like Rezeptoren in glomerulärem Endothel ist bisher nur bekannt, dass ihnen der (CpG-) DNA-spezifische TLR (TLR9) fehlt und sie als einzigen für Nukleinsäuren spezifischen Toll-like Rezeptor den TLR3 exprimieren [116]. Typ-I-Interferon induziert in dendritischen Zellen stark die Synthese von Proteinen der Nukleinsäure-Erkennung, um die antivirale Erkennungsmaschinerie in Gang zu setzen [177]. Aus dieser Überlegung heraus wurde im Folgenden unter basalen Bedingungen und nach Stimulation mit Interferon β untersucht, ob glomeruläre Endothelzellen neben TLR3 über zytosolische Rezeptoren für Nukleinsäuren verfügen, also RIG-1 und MDA5 als Moleküle der RNA-Erkennung sowie DAI/ZBP1 als Bindeprotein von DNA. Dies geschah mittels quantitativer real-time RT-PCR und Western Blot.

Expression auf Transkriptionsniveau (mRNA-Ebene)

Für die Bestimmung der Expression von Pathogenerkennungsrezeptoren in glomerulären Endothelzellen auf Transkriptionsebene wurden die Zellen in aufsteigenden Dosen mit Interferon β stimuliert. Anschließend wurde die mRNA-Expression der Rezeptoren TLR3, TLR7, TLR9, RIG-1, MDA5, DAI/ZBP1 und des Adaptermoleküls IPS-1 nach sechs und zwölf Stunden bestimmt, außerdem aus methodischen Gründen die des Interferonrezeptors IFNAR (Abbildung 13).

Wie sich zeigte, exprimierten glomeruläre Endothelzellen Nukleinsäure-Rezeptoren unter basalen Bedingungen nur sehr schwach. Jedoch steigerte eine sechsstündige Stimulation mit Interferon β die Expression von TLR3, RIG-1, MDA5, DAI/ZBP1 stark, die wiederum nach zwölf Stunden etwa auf das Ausgangsniveau zurückgefallen war. Das mitochondriale Adaptermolekül IPS-1 und der Interferonrezeptor IFNAR waren beide jeweils schon basal recht stark exprimiert und blieben dies auch nach Addition von Interferon β . Dagegen konnten TLR7 und TLR9 auch nach Gabe von Interferon β nicht nachgewiesen werden.

Das bedeutet also, dass die glomerulären Endothelzellen auf Transkriptionsebene über die Rezeptoren TLR3, RIG-1, MDA5, DAI/ZBP1 und IFNAR verfügen sowie über IPS-1. Allerdings besitzen sie weder TLR7 noch TLR9.

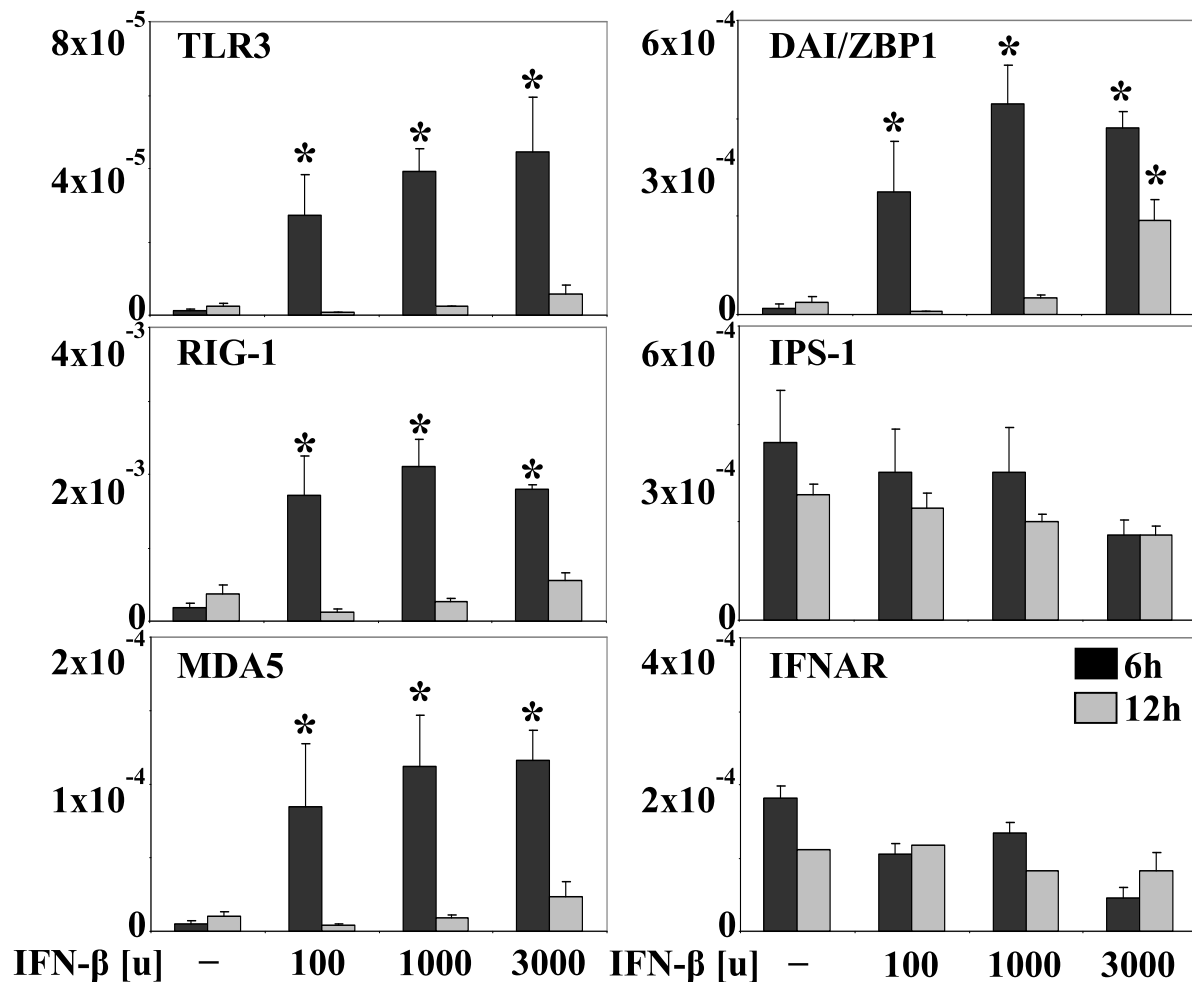


Abbildung 13: Glomeruläre Endothelzellen exprimieren Rezeptoren der RNA- und DNA-Erkennung auf Transkriptionsebene. Interferon β induziert die Expression von Pathogenerkennungszellrezeptoren der Nukleinsäure-Erkennung. Murine glomeruläre Endothelzellen (GEnC), isoliert aus der ts A58 immorto Maus [4], wurden in Anwesenheit der angegebenen Konzentrationen von IFN- β kultiviert. Nach sechs bzw. zwölf Stunden wurde die mRNA gesammelt und per quantitativer real-time RT-PCR die Expression von Molekülen der RNA-Erkennung - TLR3, RIG-1, MDA5 - sowie des zytosolischen DNA-Rezeptors DAI/ZBP1 und des Interferon-Typ-I-Rezeptors IFNAR bestimmt. Angaben von IFN- β jeweils in Units/ml, mRNA in Relation mRNA/18S rRNA. Die Daten stellen den Mittelwert dreier unabhängiger Experimente \pm SEM dar. * $p < 0.05$ vs. Medium.

Expression auf Translationsniveau (Proteinebene)

Das gewonnene Ergebnis bezüglich der Expression von Rezeptoren der Nukleinsäure-Erkennung in glomerulären Endothelzellen auf Transkriptionsniveau wurde nun mittels Western Blot verifiziert. Nach 24-stündiger Stimulation mit Interferon β wurden Proteinextrakte der GEnC im Western Blot analysiert (Abbildung 14).

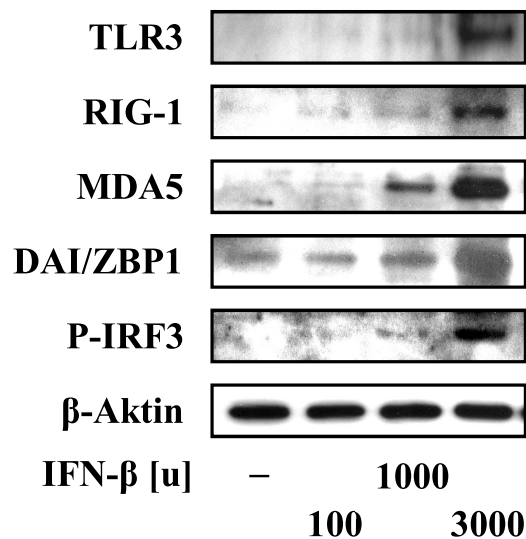


Abbildung 14: Glomeruläre Endothelzellen exprimieren Rezeptoren der RNA- und DNA-Erkennung auf Proteinebene (Western Blot). In einem ähnlichen Experiment wie in Abbildung 13 dargestellt wurden glomeruläre Endothelzellen in 24-stündiger Anwesenheit der dargestellten Dosierungen IFN- β kultiviert. Aus den Zellen gewonnene Proteinextrakte wurden mittels Western Blot – hier als Immunoblot - mit Antikörpern gegen TLR3, RIG-1, MDA5, DAI/ZBP1, Phosphoryl-(P-) IRF3 und β -Aktin inkubiert und diese sichtbar gemacht. Die Blots repräsentieren jeweils das Ergebnis dreier unabhängiger Experimente.

Man erkennt deutliche Banden für die RNA-Rezeptoren TLR3, RIG-1 und MDA5 sowie für den zytosolischen DNA-Rezeptor DAI/ZBP1, den aktivierten Interferonregulierenden Faktor Phosphoryl-IRF3 und für den Zytoskelettbestandteil β -Aktin. Die Applikation von Interferon β induzierte also auch auf Proteinebene die Synthese von Pathogenerkennungsrezeptoren der RNA- und DNA-Erkennung, und zwar proportional zur Dosis von Interferon β . Außerdem ist dem Western Blot zu entnehmen, dass Interferon β zu einer vermehrten Synthese von phosphoryliertem (d.h. aktiviertem) *Interferon-regulatory factor* (IRF) 3 führt, welcher einen wichtigen Transkriptionsfaktor im Signalweg von Typ-I-Interferon darstellt [145, 151]. Folglich bestätigte dieser Western Blot das Ergebnis der real-time RT-PCR und warf die

Frage auf, ob glomeruläre Endothelzellen mit diesen Rezeptoren Nukleinsäuren erkennen können und von diesen aktiviert werden.

3.2 Induktion proinflammatorischer Zytokine, Chemokine und Typ-I-Interferons in glomerulären Endothelzellen durch poly I:C-RNA sowie B-DNA

Glomeruläre Endothelzellen verfügen also über die wichtigen Rezeptoren TLR3, RIG-1 und MDA5 für die Erkennung von RNA sowie über DAI/ZBP1 für die Erkennung von DNA. Aber führen Nukleinsäuren über diese Rezeptoren auch tatsächlich zu einer relevanten Aktivierung des Endothels?

Poly I:C-RNA ist eine synthetische virale doppelsträngige RNA [115, 169], die erst in großen Konzentrationen membranständige Toll-like Rezeptoren in murinen oder humanen Endothelzellen aktiviert, nämlich bei etwa 10 bis 100 µg/ml [34, 37, 94, 142, 156]. Deutlich geringere Mengen aktivieren intrazelluläre zytosolische Helikasen dendritischer und mesangialer Zellen [38, 68]. Deshalb wurden die glomerulären Endothelzellen nun mit Nukleinsäuren in Kontakt gebracht, indem sie für 24 Stunden in aufsteigenden Dosen mit poly I:C-RNA oder B-DNA (poly dA/dT-DNA) inkubiert wurden. Damit die Nukleinsäuren im Zytosol intrazelluläre Rezeptoren ansprechen, waren sie jeweils vorher mit einem kationischen Lipid komplexiert worden (wie unter 2.2.1 beschrieben). Als Negativkontrolle wurde CpG-DNA verwendet, da der CpG-DNA-spezifische Rezeptor (TLR9) nicht von glomerulären Endothelzellen exprimiert wird [116] (siehe auch Kapitel 3.1). Endotoxin (Lipopolysaccharid, LPS) als bekannter inflammatorischer Aktivator von Endothelzellen diente als Positivkontrolle. Der Zellüberstand wurde mittels ELISA auf die Zytokine und Chemokine IL-6, CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CXCL10/IP-10, IL-1 β sowie auf Typ-I-Interferon (Interferon α und β) und Typ-II-Interferon (Interferon γ) hin untersucht.

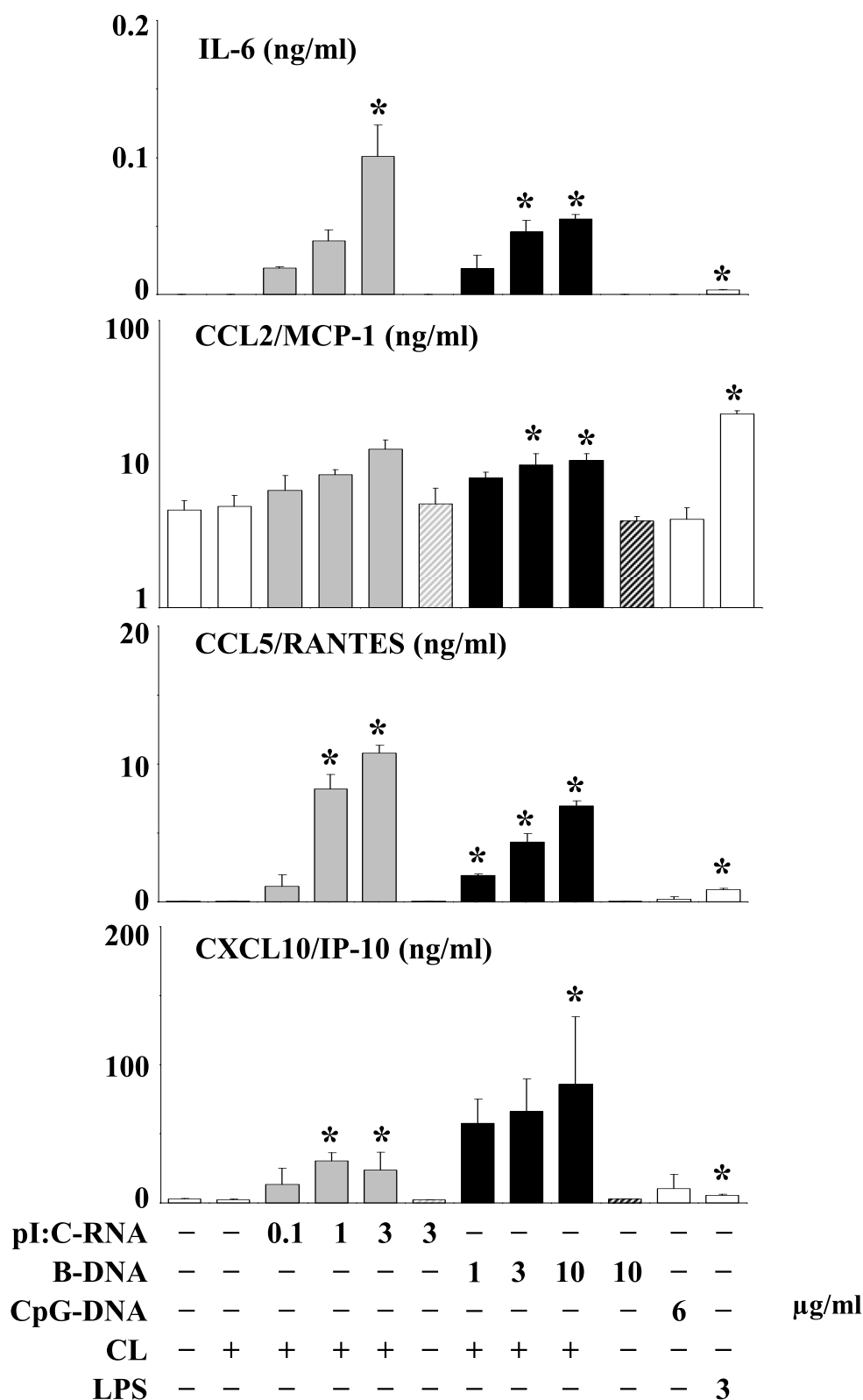


Abbildung 15: Glomeruläre Endothelzellen produzieren nach Stimulation mit doppelsträngiger RNA oder DNA inflammatorische Zytokine. Murine glomeruläre Endothelzellen (GEnC) wurden in aufsteigender Konzentration mit poly I:C-RNA oder poly dA/dT-DNA (B-DNA) stimuliert (Dosisangaben in μg/ml), jeweils alleine oder komplexiert mit kationischen Lipiden (CL, Lipofectamine®). Als Kontrolle wurden alleinige Expositionen gegenüber CL, CpG-DNA oder LPS verwendet. Nach 24 Stunden wurden die Konzentrationen von IL-6, CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES und CXCL10/IP-10 im Überstand mittels ELISA bestimmt. Die Daten stellen den Mittelwert dreier unabhängiger Experimente ± SEM dar. * p < 0.05 vs Medium.

Sowohl geringe Mengen komplexierter poly I:C-RNA als auch komplexierter B-DNA induzierten eine dosisabhängige Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-6, CCL5/RANTES und CXCL10/IP-10, komplexierte B-DNA führte auch zu Synthese von CCL2/MCP-1 (Abbildung 15). Dabei konnten sogar höhere Konzentrationen gemessen werden als in der Vergleichsgruppe mit 3 µg/ml LPS als potentem Stimulans von Endothelzellen. Es fällt auf, dass die Gabe von Nukleinsäuren ohne kationisches Lipid keinen wesentlichen Effekt hatte, ebenso wenig das kationische Lipid alleine. Dieses Ergebnis zeigt, dass glomeruläre Endothelzellen auf niedrige Dosen poly I:C-RNA oder B-DNA mit der Synthese proinflammatorischer Zytokine und Chemokine reagieren, wenn diese jeweils mit kationischen Lipiden komplexiert und in das Zytosol gelangt waren. Das Zytokin IL-1 β , welches nach Aktivierung des Inflammasomkomplexes ausgeschüttet wird, wurde von glomerulären Endothelzellen weder nach poly I:C-RNA- noch B-DNA-Exposition gebildet.

Eine spezifisch antivirale Immunantwort beinhaltet die Produktion von Typ-I-Interferon wie Interferon α und β . Aus dieser Überlegung heraus wurde per ELISA auch dessen Gehalt in den Zellüberständen ermittelt (Abbildung 16). Glomeruläre Endothelzellen synthetisierten Typ-I-Interferon, und zwar dosisabhängig signifikant gesteigert auf jeweils mit kationischem Lipid komplexierte poly I:C-RNA und B-DNA. Dass diese Reaktion spezifisch den Nukleinsäuren gilt, kann man daran festmachen, dass Lipopolysaccharid (LPS) keine Ausschüttung von Interferon α oder β bewirkte. Analog zur Zytokinproduktion trat auch hier der Effekt nur nach Komplexierung mit kationischem Lipid auf. Keines der verwendeten Stimulantien induzierte eine Synthese des Typ-II-Interferons Interferon γ .

Nukleinsäuren induzierten in glomerulären Endothelzellen also sowohl die Produktion inflammatorischer Zytokine und Chemokine als auch die spezifisch antivirale Synthese von Typ-I-Interferon, nämlich Interferon α und β .

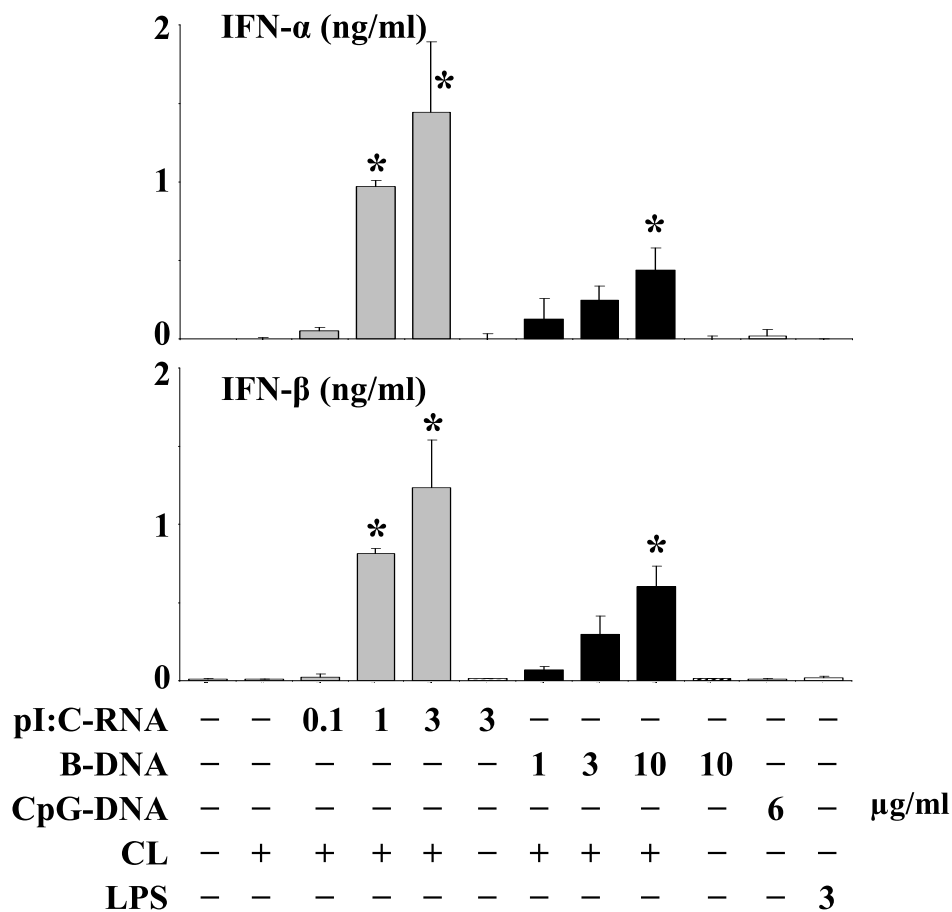


Abbildung 16: Glomeruläre Endothelzellen produzieren nach Stimulation mit doppelsträngiger RNA oder DNA spezifisch antivirales Typ-I-Interferon. Murine glomeruläre Endothelzellen (GEnC) wurden in aufsteigender Konzentration mit poly I:C-RNA oder poly dA/dT-DNA (B-DNA) stimuliert (Dosisangaben in μg/ml), jeweils alleine oder komplexiert mit kationischen Lipiden (CL, Lipofectamine®). Als Kontrolle wurden alleinige Expositionen gegenüber CL, CpG-DNA oder LPS verwendet. Nach 24 Stunden wurden die Konzentrationen der Typ-I-Interferone IFN-α und IFN-β sowie des Typ-II-Interferons IFN-γ (nicht nachweisbar, daher hier nicht im Diagramm dargestellt) im Überstand mittels ELISA bestimmt. Die Daten stellen den Mittelwert dreier unabhängiger Experimente ± SEM dar. * p < 0.05 vs Medium

3.3 Transmembran-Transport von poly I:C-RNA und B-DNA

Damit doppelsträngige RNA oder DNA von zytosolischen Nukleinsäurerezeptoren erkannt werden kann, muss sie in den Intrazellulärraum gelangen, was an dendritischen Zellen und embryonalen Fibroblasten untersucht worden ist [54, 68, 117, 145, 149].

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass die Nukleinsäuren erst nach Komplexierung mit einem kationischen Lipid nennenswerte Wirkungen auf die glomerulären Endothelzellen ausübten, weil dies den Transport in das Zellinnere erleichtert. Wir untersuchten daher näher, von welchem Membrantransportmechanismus dies abhing und ob die Nukleinsäuren fest in den Zellen verblieben.

3.3.1 Konfokalmikroskopie intrazellulär aufgenommener Nukleinsäuren

Für eine deskriptiv morphologische Beurteilung der intrazellulären Aufnahme wurde das fluoreszenzbasierte Verfahren der Konfokalmikroskopie angewendet. Jeweils 5 µg rhodaminmarkierter doppelsträngiger B-DNA wurden mit oder ohne vorherige Komplexierung mit kationischem Lipid auf glomeruläre Endothelzellen gegeben. Nach zwei Stunden wurden sie gewaschen, sodass anschließend nur fest intrazellulär gespeicherte DNA zu erkennen sein sollte. Das Zellskelett wurde mit FITC-markiertem Phalloidin gefärbt, folglich waren in der anschließenden Konfokalmikroskopie die markierten Nukleinsäuren rot, das Zellskelett grün zu erkennen (Abbildung 17).

Nur wenn die markierte B-DNA vorher mit kationischem Lipid komplexiert worden war, blieb sie auch nach dem Waschvorgang noch zu detektieren. Die übereinander gelegten Fluoreszenzaufnahmen von Zellskelett und DNA zeigen, dass die glomerulären Endothelzellen nur die komplexierte DNA gespeichert hatten, nicht jedoch die reine DNA. Kationische Lipide erleichtern also die intrazelluläre Aufnahme der Nukleinsäure.

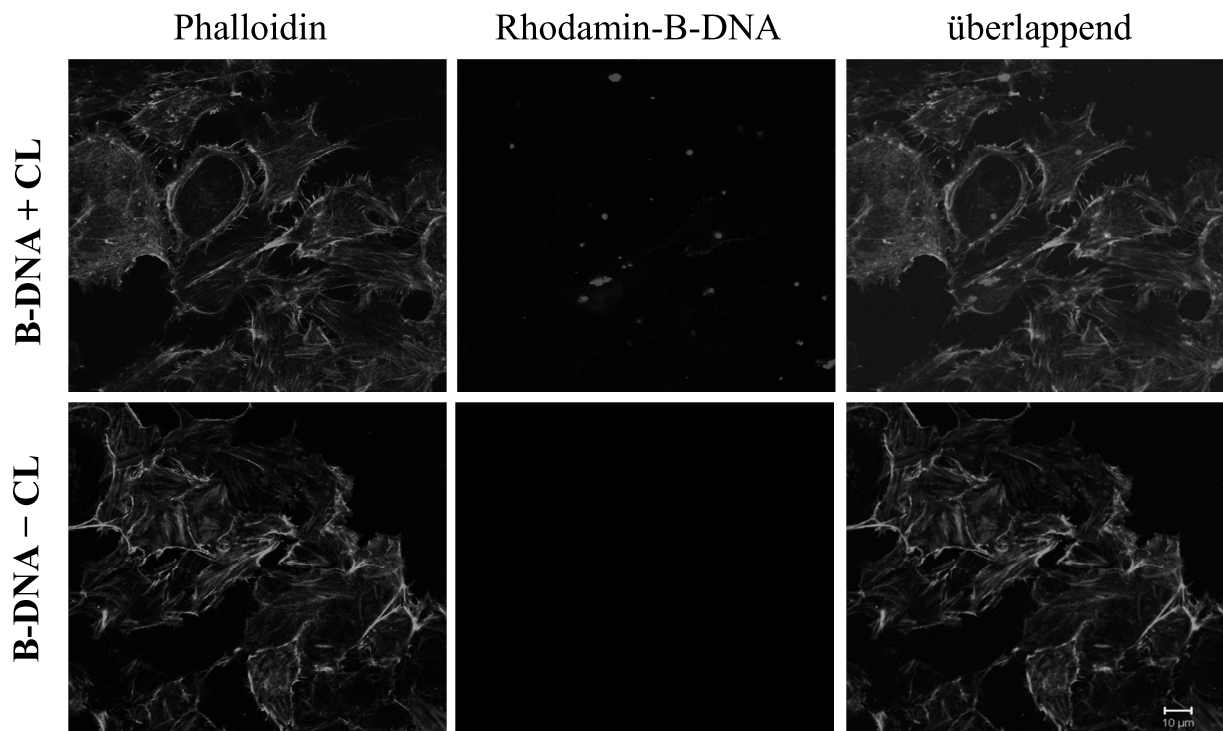


Abbildung 17: Kationisches Lipid (CL) verstärkt die intrazelluläre Nukleinsäureaufnahme in glomeruläre Endothelzellen. Murine glomeruläre Endothelzellen (GEnC) wurden in An- bzw. Abwesenheit von kationischen Lipiden (CL, Lipofectamine®) und rhodaminmarkierter poly dA/dT-DNA (B-DNA) kultiviert. Anschließend wurde die intrazelluläre Aufnahme der B-DNA mittels Konfokalmikroskopie beurteilt. Vergrößerung 400-fach. Rot erscheint dem Betrachter die B-DNA, grün das mit FITC-Phalloidin gefärbte Zytoskelett der GEnC.

3.3.2 Clathrin-abhängige Endozytose

Prinzipiell können Nukleinsäuren über verschiedene Mechanismen in eine Zelle gelangen, weshalb im Folgenden einzelne Wege der intrazellulären Aufnahme spezifisch geprüft wurden. Hierzu wurden glomeruläre Endothelzellen mit diversen Substanzen prä-inkubiert, die jeweils einen Aufnahmeweg selektiv blockieren. Anschließend wurde mit komplexierter poly I:C-RNA oder B-DNA für 24 Stunden stimuliert und mittels ELISA die Konzentration des Zytokins CXCL10/IP-10 bestimmt (Abbildung 18). Chloroquin diente hierbei zur Hemmung von endosomaler Ansäuerung und Aktivierung von TLR3, TLR7 und TLR9 [61], Cytochalasin D zur Verhinderung von Phagozytose [61], Chlorpromazin zur Blockierung von Clathrin-abhängiger Endozytose [61, 134] und Methyl- β -Cyclodextrin dazu, der Caveolae-vermittelten Endozytose entgegen zu wirken [114].

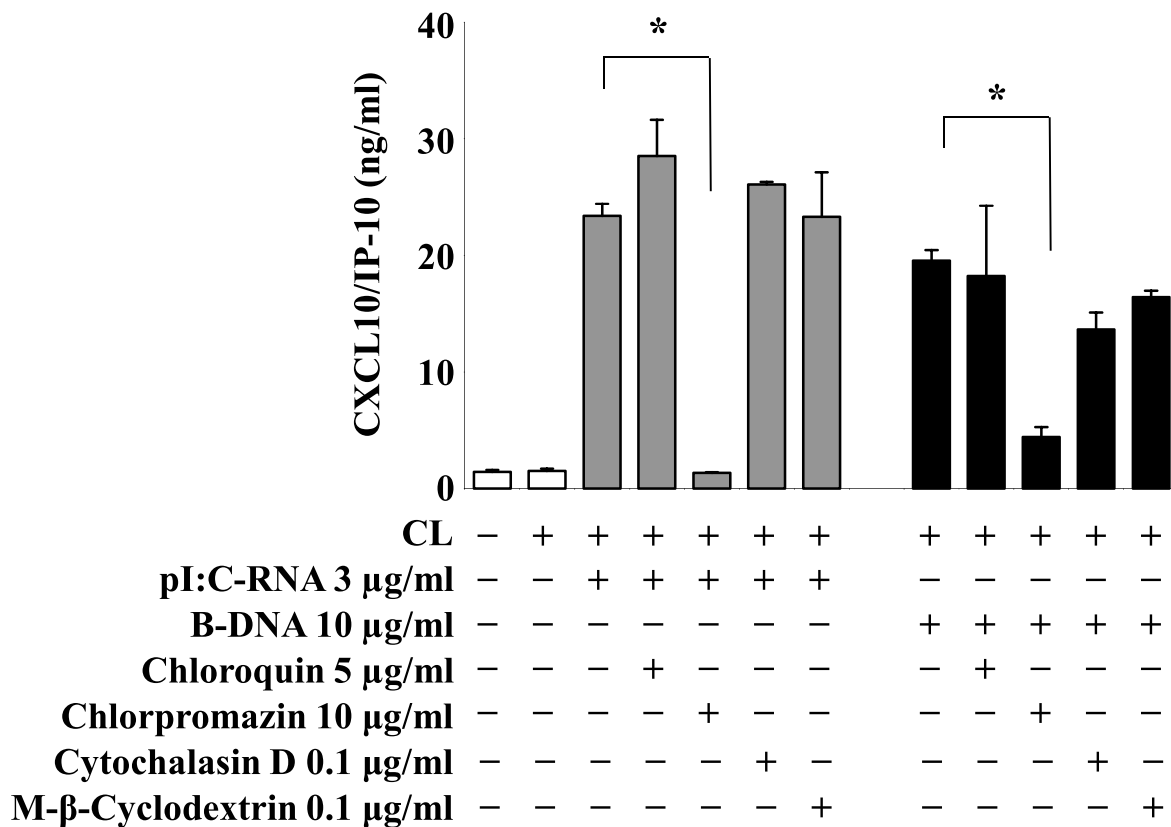


Abbildung 18: Chlorpromazin blockiert die nukleinsäureabhängige Produktion von CXCL10/IP-10. Murine glomeruläre Endothelzellen wurden mit poly I:C-RNA oder B-DNA (poly dA/dT-DNA) im Komplex mit kationischen Lipiden (CL, Lipofectamine®) in Ab- bzw. Anwesenheit von Chloroquin, Chlorpromazin, Cytochalasin D oder Methyl-β-Cyclodextrin stimuliert. Nach 24 Stunden wurde die Konzentration von CXCL10/IP-10 im Überstand per ELISA bestimmt. Die Daten stellen den Mittelwert dreier unabhängiger Experimente ± SEM dar. * $p < 0.05$.

Deutlich zu erkennen ist, dass die von den glomerulären Endothelzellen synthetisierte Menge CXCL10/IP-10 nach Addition von poly I:C-RNA oder B-DNA (jeweils mit kationischem Lipid komplexiert) nur dann signifikant erniedrigt war, wenn zuvor mit Chlorpromazin präinkubiert worden war. Die Konzentration des Chemokins in den Zellüberständen der mit Chloroquin, Cytochalasin D oder Methyl-β-Cyclodextrin vorbehandelten glomerulären Endothelzellen unterschied sich nicht von der jeweiligen Vergleichsgruppe, welche nur mit komplexierter Nukleinsäure stimuliert worden war. Daraus lässt sich schließen, dass die Clathrin-vermittelte Endozytose entscheidend für die Aktivierung der glomerulären Endothelzellen durch diese Nukleinsäuren sein muss. Gleichzeitig spielt endosomale Ansäuerung offenbar keine Rolle, da Chloroquin die Chemokinproduktion nicht beeinflusste.

3.4 Intrazellulärer Signalweg

3.4.1 Erkennung von RNA und DNA unabhängig von MyD88

Hinsichtlich des intrazellulären Signalweges beurteilten wir zunächst, ob das Adapterprotein MyD88 für die Aktivierung glomerulärer Endothelzellen durch poly I:C-RNA oder B-DNA eine wichtige Funktion übernimmt. Die Zellen wurden wie üblich kultiviert und über 24 Stunden mit einem Peptid prä-inkubiert, welches MyD88 funktioniell inhibiert, indem es die Homodimerisierung von MyD88 blockiert.

MyD88 ist ein Adapterprotein, welches die Toll-like Rezeptoren und Interleukin-1 Rezeptoren (IL-1R) mit nachfolgenden Molekülen der Signalkaskade verbindet. Dabei ist die Homodimerisierung von MyD88 ein entscheidender Schritt um die Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte Kinase (IRAK) zu aktivieren. Das verwendete MyD88-Inhibitorpeptid enthält eine Aminosäuresequenz, die an eine Domäne von MyD88 bindet, sodass das Monomer an das Inhibitorpeptid gekoppelt ist und nicht mehr mit dem gegenüberliegenden Monomer dimerisieren kann [95]. Ein unwirksames Kontrollpeptid mit abgewandelter Primärstruktur wurde in der Vergleichsgruppe appliziert.

Beide Peptide wurden 24 Stunden vor der eigentlichen Stimulation in einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ verwendet. Anschließend wurde das Zellmedium nicht ausgetauscht und 3 $\mu\text{g/ml}$ poly I:C-RNA bzw. 10 $\mu\text{g/ml}$ B-DNA (poly dA/dT-DNA) hinzugegeben, jeweils mit kationischen Lipiden komplexiert, außerdem 3 $\mu\text{g/ml}$ des Lipopeptids Pam3CSK4, welches als TLR2-Agonist MyD88 für den weiteren Signalweg erfordert und hier somit als Positivkontrolle Verwendung fand. Nach 24-stündiger Stimulation wurde der Zellüberstand abgenommen und die Konzentration des Chemokins CCL2/MCP-1 mittels ELISA bestimmt (Abbildung 19).

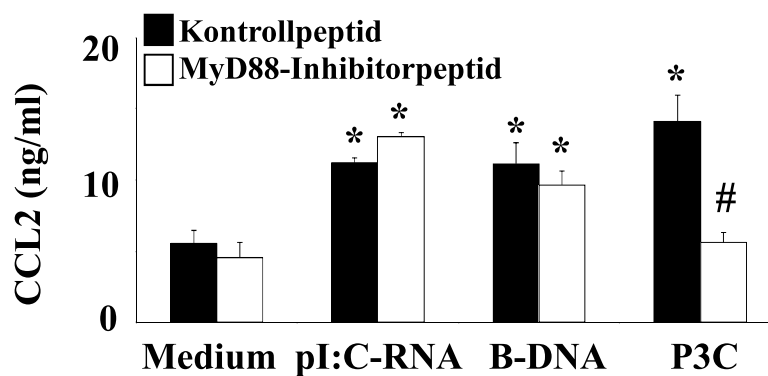


Abbildung 19: Die Aktivierung glomerulärer Endothelzellen durch Nukleinsäuren ist unabhängig von MyD88. Zunächst wurden glomeruläre Endothelzellen für 24 Stunden mit einem MyD88-inhibitorischen Peptid oder unwirksamen Kontrollpeptid inkubiert und anschließend mit 3 µg/ml poly I:C-RNA, 10 µg/ml poly dAdT-DNA (B-DNA), jeweils im Komplex mit kationischen Lipiden (Lipofectamine®), oder 3 µg/ml Pam3CSK4 (P3C) stimuliert. Die Konzentration von CCL2/MCP-1 im Zellüberstand wurde nach 24 Stunden per ELISA ermittelt. Die Daten stellen den Mittelwert dreier unabhängiger Experimente ± SEM dar. * $p < 0.05$ vs. Medium, # $p < 0.05$ vs. Kontrollpeptid.

Die funktionelle Blockierung von MyD88 kann hierbei als gegeben bewertet werden, da das Inhibitorpeptid die Synthese von CCL2/MCP-1 nach Addition von Pam3CSK4 vollständig verhindert hatte. Ähnliches kann jedoch nicht für mit kationischem Lipid komplexierte poly I:C-RNA oder B-DNA beobachtet werden, denn die Konzentration von synthetisiertem CCL2/MCP-1 ist in Kontroll- und Interventionsgruppe vergleichbar hoch. Das bedeutet, dass zur Aktivierung der glomerulären Endothelzellen durch komplexierte poly I:C-RNA oder B-DNA MyD88 als Adaptermolekül nicht benötigt wird.

3.4.2 Funktioneller Gen-Knockdown der zytosolischen Rezeptoren der RNA- und DNA-Erkennung mittels short interfering RNA

Intrazelluläre Erkennung von poly I:C-RNA abhängig von RIG-1

Als Sensoren für poly I:C-RNA in dendritischen Zellen wurden bisher die zytosolischen Pathogenerkennungsrezeptoren *Retinoid acid inducible Gene 1* (RIG-1) und *Melanoma Differentiation-Associated Gene 5* (MDA5) beschrieben [68], unklar ist ihre Rolle bei der Signaltransduktion in glomerulären Endothelzellen. Ihre Beteiligung bei der Erkennung von poly I:C-RNA wurde im Folgenden mittels selektiver funktioneller Suppression durch Gen-Knockdowns mit *short interfering RNA* (siRNA) ermittelt. Glomeruläre Endothelzellen wurden hierzu während der Kultivierung zweimal mit jeweils gegen RIG-1 oder MDA5 gerichteter siRNA transfiziert, bevor sie mit poly I:C-RNA, im Komplex mit kationischem Lipid, stimuliert wurden. Als Kontrolle diente unspezifische siRNA. Nach sechsständiger Stimulation wurde die mRNA der Zellen gesammelt und einer quantitativen real-time RT-PCR zugeführt, um die mRNA-Expression der Zielgene RIG-1, MDA5, Interleukin-6 und Interferon β zu untersuchen (Abbildung 20).

Der Gen-Knockdown wurde deshalb als erfolgreich gewertet, weil die Expression von RIG-1 bzw. MDA5 bei Applikation von siRNA im Vergleich zur Kontroll-siRNA statistisch signifikant auf nur etwa 30 % des Vergleichswertes gesunken war. Der Knockdown von RIG-1 bewirkte zudem eine statistisch signifikante Senkung der Genexpression des inflammatorischen Zytokins IL-6 und des Typ-I-Interferons Interferon β (Abbildung 20A). Die Ausschaltung von MDA5 hingegen führte zu keinerlei Reduktion der Zytokinexpression (Abbildung 20B).

Demzufolge besitzt RIG-1 in glomerulären Endothelzellen einen wesentlichen Anteil daran, intrazelluläre poly I:C-RNA zu erkennen und Signalkaskade einzuleiten, die in der Transkription der Zytokine IL-6 und Interferon β mündet. MDA5 scheint hierbei nicht involviert zu sein.

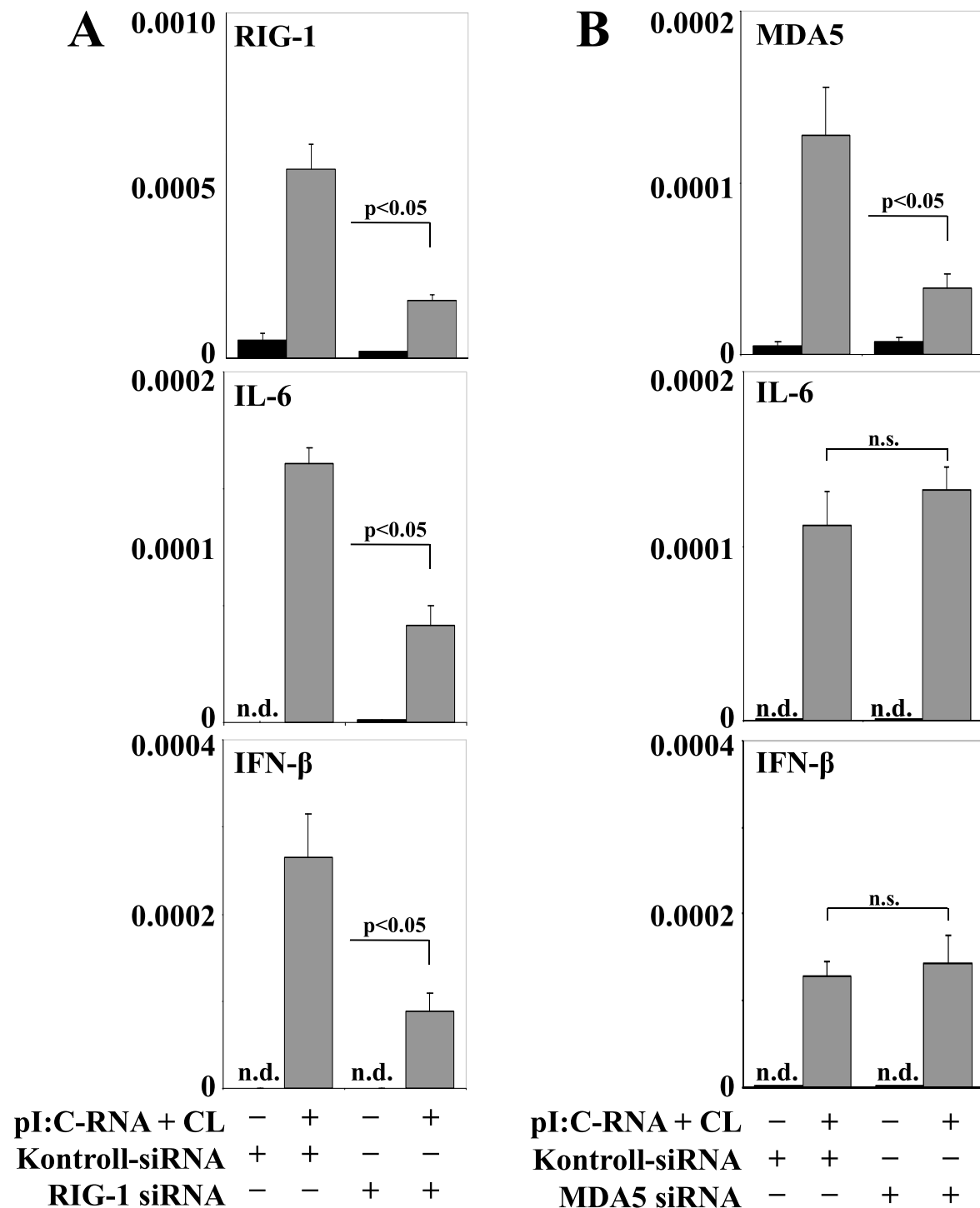


Abbildung 20: Poly I:C-RNA/CL-Komplexe aktivieren glomeruläre Endothelzellen RIG-1-vermittelt, nicht über MDA5. Glomeruläre Endothelzellen wurden zweimalig mit einer Kontroll-siRNA oder einer für RIG-1 bzw. MDA5 spezifischen siRNA transfiziert, bevor sie mit poly I:C-RNA im Komplex mit kationischen Lipiden (CL, Lipofectamine®) stimuliert wurden. Nach sechs Stunden wurde die mRNA per quantitativer real-time RT-PCR quantifiziert (in Relation mRNA/18S rRNA, Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente \pm SEM). n.d. = nicht detektierbar, n.s. = nicht signifikant.

Intrazelluläre Erkennung von poly dA/dT-DNA (B-DNA) DAI/ZBP1 vermittelt

Wie für die Detektierung von RNA ist auch noch kein Aktivierungsmechanismus glomerulärer Endothelzellen durch B-DNA beschrieben. Über die Wahrnehmung von B-DNA mittels DAI/ZBP1 wurde von Takaoka et al. berichtet [149], siehe auch 1.6.3, jedoch scheinen noch weitere, bislang unbekannte, Rezeptoren zu existieren. Ob DAI/ZBP1 auch in glomerulären Endothelzellen eine wichtige Funktion übernimmt, wurde mithilfe von siRNA genauer analysiert, analog zum oben beschriebenen Gen-Knockdown für RIG-1 und MDA5. Die glomerulären Endothelzellen wurden je zweimal mit einer gegen DAI/ZBP1 gerichteten spezifischen siRNA oder unwirksamen Kontroll-siRNA transfiziert, bevor mit poly dA/dT-DNA im kationischen Lipidkomplex stimuliert wurde. Nach sechs Stunden wurde die RNA der Zellen gesammelt und die Genexpression von DAI/ZBP1, IL-6 und Interferon β mittels quantitativer real-time RT-PCR untersucht (Abbildung 21).

Dass der Gen-Knockdown von DAI/ZBP1 erfolgreich war, lässt sich mit der statistisch signifikanten Senkung der mRNA-Expression für DAI/ZBP1 begründen, die nur noch etwa 30 % des Ausgangsniveaus betrug. Jedoch unterschieden sich die gemessenen mRNA-Einheiten des Zytokins IL-6 und des Typ-I-Interferons Interferon β nicht statistisch signifikant von der Vergleichsgruppe.

Offenbar basiert die Produktion dieser Zytokine in glomerulären Endothelzellen nach Addition von B-DNA-Komplexen folglich nicht auf dem DNA-Rezeptor DAI/ZBP1.

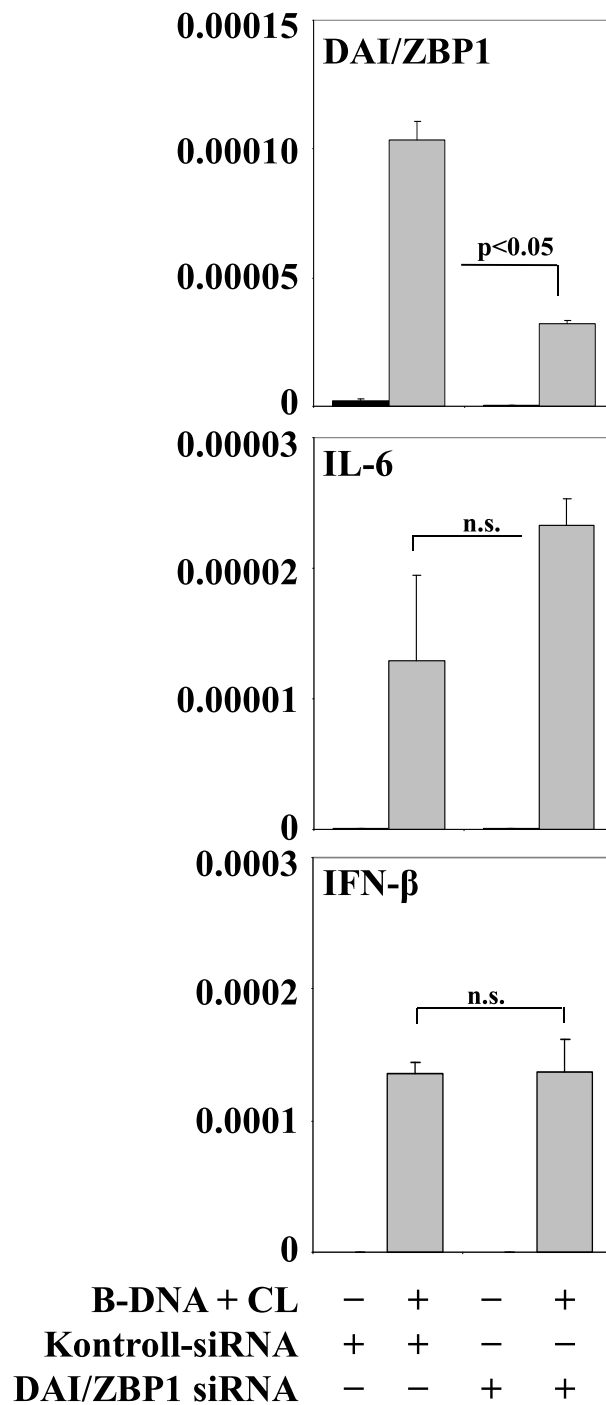


Abbildung 21: B-DNA/CL-Komplexe aktivieren glomeruläre Endothelzellen unabhängig von DAI/ZBP. Glomeruläre Endothelzellen wurden zweimalig mit einer Kontroll-siRNA oder einer für DAI/ZBP1 spezifischen siRNA transfiziert, bevor sie mit B-DNA (poly dA/dT-DNA) im Komplex mit kationischen Lipiden (CL, Lipofectamine®) stimuliert wurden. Nach sechs Stunden wurde die mRNA per real-time RT-PCR quantifiziert. Angaben im Verhältnis mRNA/18S rRNA. Die Daten zeigen jeweils den Mittelwert dreier unabhängiger Experimente \pm SEM. n.d = nicht detektierbar, n.s. = nicht signifikant.

3.5 Typ-I-Interferon-vermittelte antivirale Effekte auf glomeruläre Endothelzellen

In dendritischen Zellen bewirkt die Erkennung viraler RNA eine Ausschüttung von Typ-I-Interferon. Dieses unterstützt seinerseits über eine autokrine und parakrine positive Rückkopplung wiederum die TLR-Signaltransduktion mittels Phosphorylierung des Interferonrezeptors IFNAR und des STAT1-Proteins [41]. Studien an Mesangialzellen deuten auf einen ähnlichen positiven Rückkopplungsmechanismus für die Aktivierung durch poly I:C-RNA hin [38]. Aus diesem Grund lag die Frage danach nahe, wie glomeruläre Endothelzellen auf Typ-I-Interferon reagieren, das im Entzündungsmilieu von anderen Zellen oder von glomerulären Endothelzellen selbst ausgeschüttet wird (siehe 3.2).

3.5.1 Zytokinproduktion nach exogener Interferon- β -Exposition

Wie unter 3.1 angeführt, steigert exogen zu glomerulären Endothelzellen gegebenes Interferon β die Synthese von wichtigen Molekülen der Nukleinsäure-Erkennung, nämlich TLR3, RIG-1, MDA5, DAI/ZBP1, IPS-1, P-IRF3 und IFNAR. Nun wurde evaluiert, ob Typ-I-Interferon auch eine nennenswerte Wirkung auf die Synthese inflammatorischer Zytokine und interferonabhängige Proteine besitzt, indem die glomerulären Endothelzellen mit Interferon β stimuliert wurden und die Expression diverser Zytokine nach sechs bzw. zwölf Stunden mittels quantitativer real-time RT-PCR untersucht wurde. Interferon β hob in glomerulären Endothelzellen die Menge nachweisbarer mRNA der Chemokine CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CXL10/IP-10 sowie des Interferon-induzierbaren Proteins p78 (auch bekannt als MX-1) dosisabhängig signifikant an (Abbildung 22A), nicht jedoch die von Interferon α und von IL-6 (nicht gezeigt).

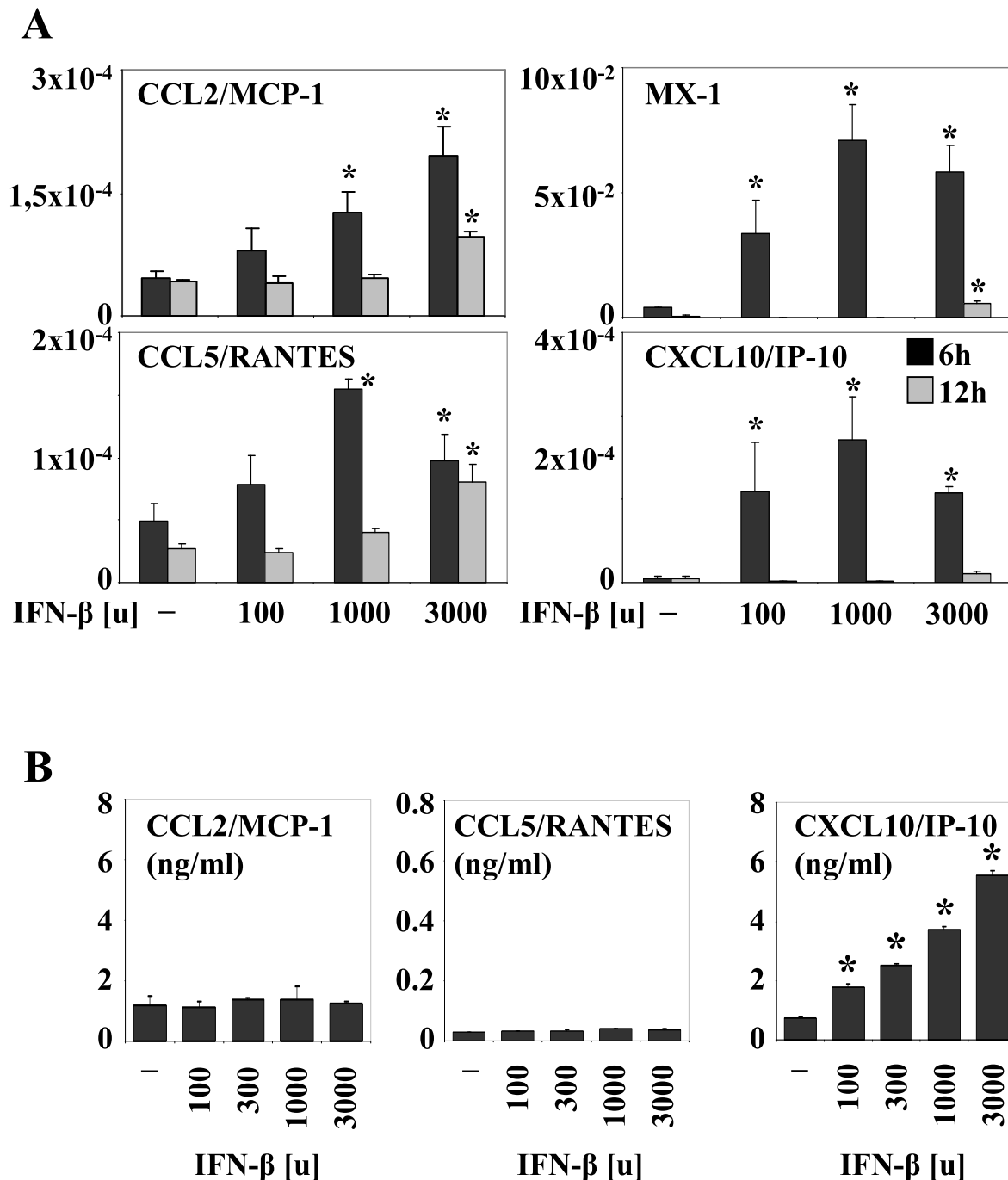


Abbildung 22: Interferon β induziert in glomerulären Endothelzellen die Zytokin- und Chemokinexpression. Glomeruläre Endothelzellen (GEnC) wurden in Anwesenheit der angegebenen Einheiten von IFN- β kultiviert. **A:** Nach sechs bzw. zwölf Stunden wurde per quantitativer real-time RT-PCR die Expression verschiedener Chemokine und des Interferon-induzierbaren Proteins p78 (MX-1) ermittelt (jeweils in Relation mRNA/18S rRNA). **B:** Nach 24 Stunden wurden die angegebenen Chemokine im Zellüberstand mittels ELISA bestimmt. Angaben von IFN- β jeweils in Units/ml. Die Daten stellen den Mittelwert dreier unabhängiger Experimente \pm SEM dar. * $p < 0.05$ vs. Medium.

Eine Validierung der Ergebnisse auf Proteinebene erfolgte nach 24-stündiger Stimulation per ELISA (Abbildung 22B). Im Zellüberstand blieben die Konzentrationen von CCL2/MCP-1 und CCL5/RANTES nach Applikation von Interferon β unbeeinflusst, lediglich für das Chemokin CXCL10/IP-10 konnte eine dosisabhängig erhöhte Ausschüttung nachgewiesen werden.

Verglichen mit den Zytokinkonzentrationen, die die glomerulären Endothelzellen nach der Gabe von poly I:C-RNA- oder B-DNA-Komplexen produziert hatten (siehe Abbildung 15), waren die nach Interferon- β -Exposition gemessenen Werte für CXCL10/IP-10 allerdings sehr gering: nur ca. 6 ng/ml nach 3000 Einheiten Interferon β im Vergleich zu 50 bis 100 ng/ml nach poly I:C-RNA- oder B-DNA-Komplexen.

3.5.2 Keine autokrine oder parakrine Stimulation der glomerulären Endothelzellen durch endogen produziertes Typ-I-Interferon

Dieses Ergebnis wies daraufhin, dass Interferon β offenbar keinen direkten Einfluss auf die glomerulären Endothelzellen ausüben könnte. Ob das von den glomerulären Endothelzellen produzierte Typ-I-Interferon (siehe 3.2) eine positive Rückkopplung im Sinne einer autokrin-parakrinen Aktivierungsschleife auf die Zellen zur Folge hat, welche die Zytokinproduktion verstärkt, wurde mithilfe von Antikörpern untersucht, welche Typ-I-Interferon blockieren und funktionell neutralisieren. Hierzu wurden glomeruläre Endothelzellen kultiviert und mit gegen Interferon α und Interferon β gerichteten Antikörpern inkubiert. Gleichzeitig wurden die Zellen mit poly I:C-RNA- oder B-DNA-/CL-Komplexen stimuliert, sodass nach 24 Stunden im Zellüberstand die Proteinkonzentration des Chemokins CXCL10/IP-10 bestimmt werden konnte (Abbildung 23).

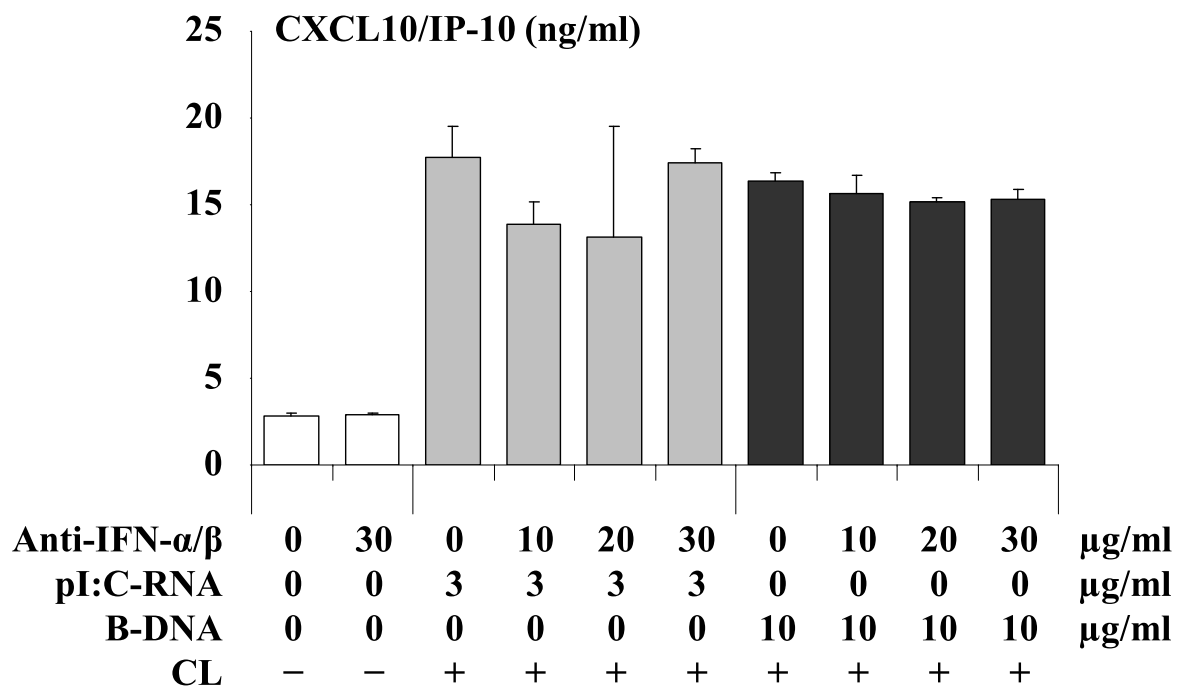


Abbildung 23: Typ-I-Interferon aktiviert glomeruläre Endothelzellen (GEnC) nicht autokrin bzw. parakrin im Sinne einer positiven Rückkopplung. GEnC wurden mit poly I:C-RNA oder B-DNA (poly dA/dT-DNA) im Komplex mit kationischen Lipiden (CL, Lipofectamine®) stimuliert. Gleichzeitig wurden IFN- α - und IFN- β -neutralisierende Antikörper hinzugegeben, die endogen produziertes Interferon α oder β abfangen sollten. Nach 24 Stunden erfolgte die Bestimmung von CXCL10/IP-10 im Zellüberstand per ELISA. Die Daten stellen jeweils Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente \pm SEM dar.

Auf die Nukleinsäure-Komplexe reagierten die glomerulären Endothelzellen entsprechend mit einer hohen Ausschüttung von CXCL10/IP-10. Jedoch zeigte sich keinerlei Reduktion der synthetisierten Chemokinkonzentration, wenn gleichzeitig Typ-I-Interferon-neutralisierende Antikörper appliziert worden waren.

Dieses Resultat lässt darauf schließen, dass zytosolisch eingebrachte Komplexe von poly I:C-RNA und B-DNA die glomerulären Endothelzellen zwar dahingehend stimulieren können, Typ-I-Interferon zu produzieren (siehe 3.2). Dieses wirkt sich jedoch nicht autokrin oder parakrin auf die Zellen aus, um die Aktivierung im Sinne einer positiven Rückkopplungsschleife zu verstärken.

3.6 Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 in glomerulären Endothelzellen nach Nukleinsäure-Exposition *in vitro* und *in vivo*

Eine Endothelzellaktivierung kann mit einer verstärkten Synthetisierung luminaler Adhäsionsmoleküle einhergehen. Diese übernehmen eine wichtige Funktion bei der Leukozytentransmigration, speziell bei der Adhäsion rollender Leukozyten [120]. Mithilfe des Verfahrens der Durchflusszytometrie wurden die Effekte von poly I:C-RNA und B-DNA auf die Synthetisierung von Adhäsionsmolekülen bei glomerulären Endothelzellen näher beleuchtet (Abbildung 24).

Nach üblicher Kultivierung und 24-stündiger Stimulation mit poly I:C-RNA (im Komplex mit kationischem Lipid) war eine signifikante Zunahme des Anteils glomerulärer Endothelzellen, die positiv für die Oberflächenmoleküle ICAM-1 (CD54) oder VCAM-1 (CD106) waren, zu beobachten, wobei der Effekt auch hier von der Komplexierung mit kationischen Lipiden abhing. Für komplexierte B-DNA war eine Signifikanz nur für ICAM-1 auszumachen. Ebenfalls signifikant und deutlich größer fiel die Steigerung der Anzahl ICAM-1- oder VCAM-1-positiver Zellen durch das als Endothelstimulans bekannte Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS) aus, das zu einer enormen Induktion dieser Adhäsionsmoleküle führte und hier als Positivkontrolle Verwendung fand.

Welche Bedeutung diese *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse zur ICAM-1-Expression *in vivo* haben, konnten wir freundlicherweise in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. med. vet. Dr. med. habil. Fritz Krombach und Herrn Dr. med. Christoph Reichel näher untersuchen, denen besonderer Dank für die Anwendung der intravitalmikroskopischen Verfahren gewidmet sei. Mittels Videoanalyse wurden die Vorgänge des Leukozytenrollens, der festen Leukozytenadhäsion und der transendothelialen Leukozytenmigration an postkapillären Venolen im Musculus cremaster männlicher C57BL/6-Mäuse betrachtet, nachdem sechs Stunden zuvor intraskrotal entweder Salzlösung (PBS), kationische Lipide (CL) oder Komplexe aus B-DNA und kationischen Lipiden (B-DNA/CL) injiziert worden waren (Abbildung 25).

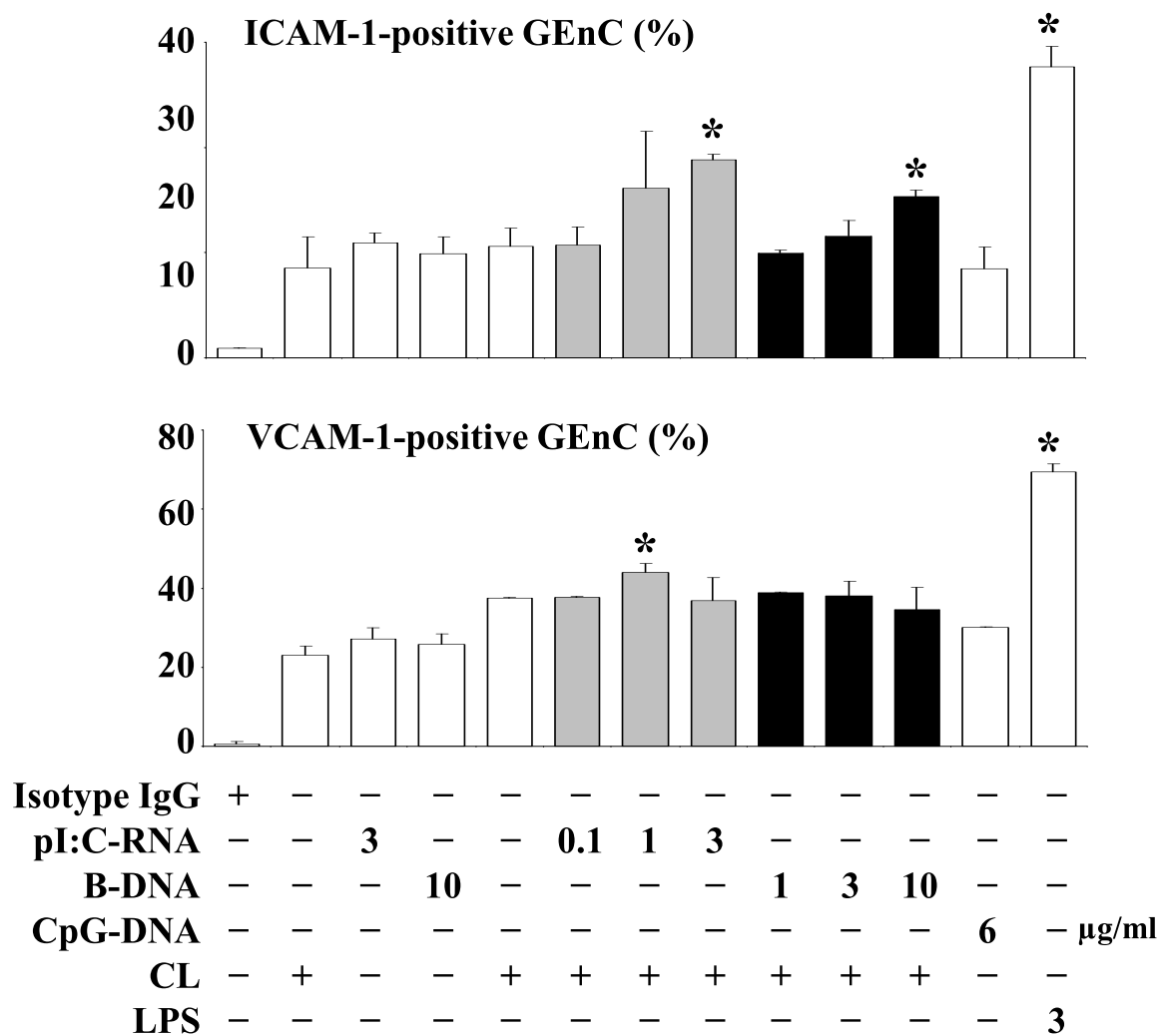


Abbildung 24: Poly I:C-RNA und B-DNA induzieren die Expression von Adhäsionsmolekülen *in vitro*. Murine glomeruläre Endothelzellen (GEnC) wurden mit den angegebenen Konzentrationen poly I:C-RNA oder poly dA/dT-DNA (B-DNA) stimuliert (Dosisangaben in $\mu\text{g/ml}$), jeweils alleine oder komplexiert mit kationischen Lipiden (CL, Lipofectamine®). Als Kontrollsubstanzen wurden kationische Lipide alleine, CpG-DNA oder Lipopolysaccharid (LPS) verwendet. Nach 24 Stunden wurde per Durchflusszytometrie jeweils der Anteil von GEnC bestimmt, der an seiner Oberfläche das Adhäsionsmolekül ICAM-1 bzw. VCAM-1 exprimiert. Die Daten stellen den Mittelwert dreier unabhängiger Experimente \pm SEM dar. * $p < 0.05$ vs Medium.

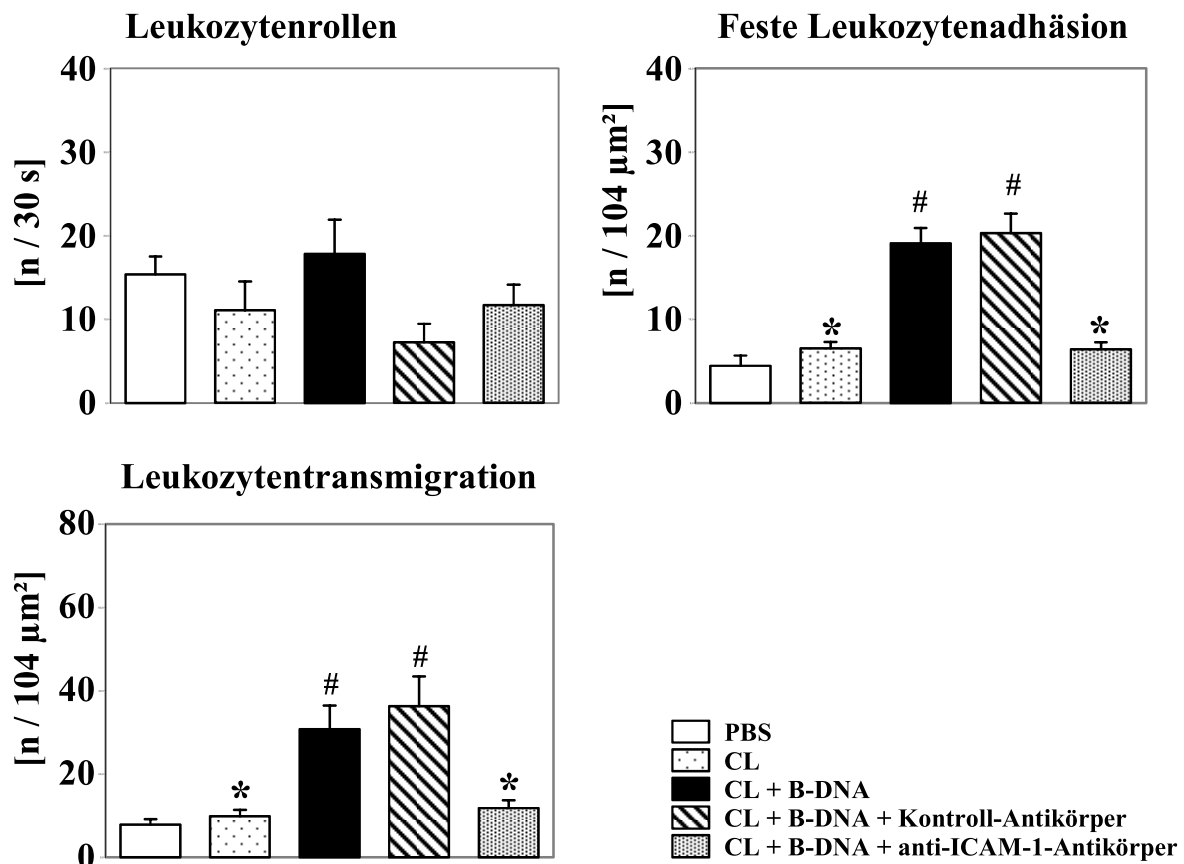


Abbildung 25: B-DNA verstärkt die Leukozytenadhäsion und -transmigration *in vivo*. Die intravitalmikroskopischen Videoaufnahmen wurden an Venolen im Musculus cremaster männlicher C57BL/6-Mäuse durchgeführt, nachdem jeweils vier Mäusen pro Gruppe intraskrotal PBS, kationische Lipide (CL) oder Komplexe aus 10 μg B-DNA und kationischen Lipiden (B-DNA/CL) mit zusätzlichen anti-ICAM-1-Antikörpern bzw. IgG-Isotypenkontrolle injiziert worden waren. Nach sechs Stunden wurde die Anzahl rollender Leukozyten, fest adhärenter Leukozyten und transendothelial migrierter Leukozyten bestimmt. Die Daten stellen jeweils Mittelwerte \pm SEM dar. # $p < 0.05$ vs. CL, * $p < 0.05$ vs. B-DNA/CL.

Keinen Einfluss hatten mit kationischem Lipid komplexierte B-DNA-Injektionen demnach auf die Anzahl rollender Leukozyten, die in allen Versuchsgruppen ähnlich stark ausgeprägt war. Allerdings steigerten Applikationen von B-DNA/CL-Komplexen die Anzahl fest adhärenter und transendothelial in das Interstitium übergetretener Leukozyten signifikant. Nach Applikation eines ICAM-1-neutralisierenden Antikörpers konnte dieser Effekt vollständig aufgehoben werden, sodass ICAM-1 *in vivo* offensichtlich eine wichtige Funktion bei der B-DNA vermittelten Leukozytendiapedese übernimmt.

3.7 Albuminübertritt durch glomeruläre Endothelzellen *in vitro* und transendotheliale Permeabilität *in vivo* nach Nukleinsäure-Exposition

Gemeinsam mit der im Glomerulus befindlichen Basalmembran und den Fußfortsätzen der Podozyten bildet das glomeruläre Endothel die glomeruläre Filtrationsbarriere und übernimmt somit bei deren Aufrechterhaltung eine wichtige Funktion [46]. Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe an nephritischen Mäusen offenbarten, dass eine systemische Applikation von poly I:C-RNA und B-DNA die Proteinurie solcher Mäuse verstärkt [5, 115].

Ob diese Permeabilitätssteigerung auch auf die Aktivierung glomerulärer Endothelzellen zurückgeht, wurde hier mit einer *in-vitro*-Permeabilitätsstudie überprüft, d.h. es wurde der Übertritt von Fluorescein-Isothiocyanat-(FITC)-Albumin durch eine Mono-Zellschicht glomerulärer Endothelzellen gemessen, die auf einer porösen Polyethylenterephthalat-Membran (Porengröße 1 μm) kultiviert wurden. Nach sechs, 24 und 48 Stunden wurde jeweils die FITC-Albumin-Konzentration ermittelt, die hindurchgetreten war (Abbildung 26). Dabei fiel zunächst auf, dass sich die Durchlässigkeit glomerulärer Endothelzellen für bovines Serumalbumin (BSA) *in vitro* im Laufe der Zeit für alle Gruppen erhöhte. Allerdings resultierte die Applikation komplexierter poly I:C-RNA oder B-DNA im Vergleich zur Kontrollgruppe in signifikant gesteigerter Permeabilität für Albumin. Während nach Addition von poly I:C-RNA-Komplexen eine statistisch signifikante Erhöhung der Durchlässigkeit für Albumin bereits nach 24 Stunden zu beobachten war, lag diese für B-DNA-Komplexe nach 48-stündiger Exposition vor.

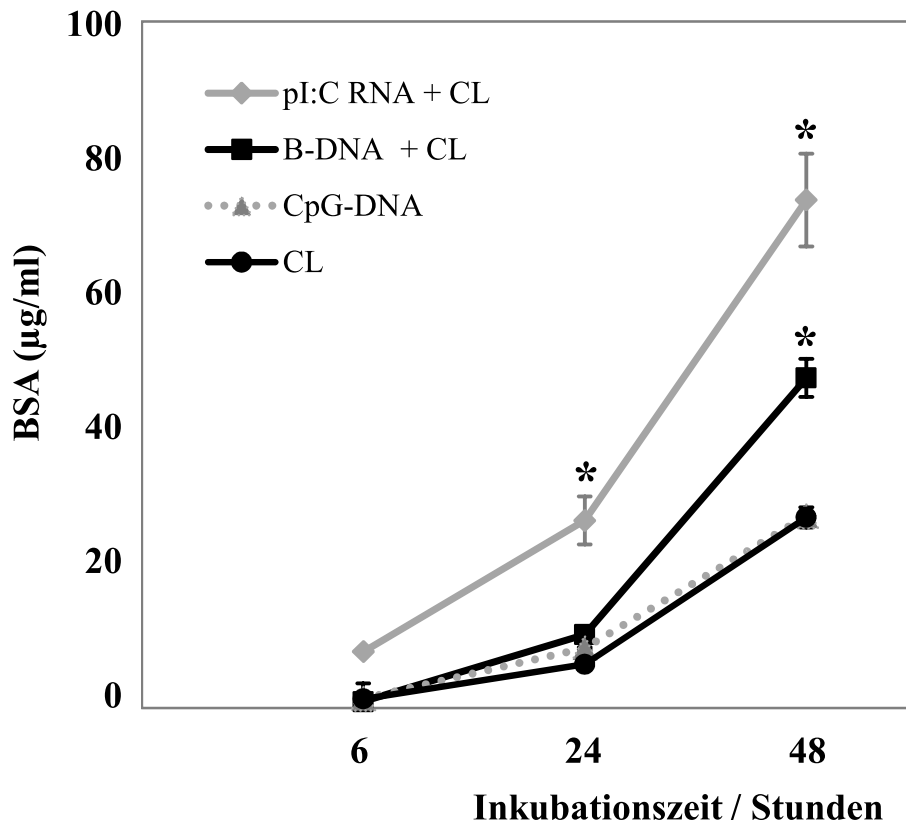


Abbildung 26: Erhöhter Albumindurchtritt durch eine einschichtige Lage glomerulärer Endothelzellen nach Nukleinsäure-Stimulation. Glomeruläre Endothelzellen (GEnC) wurden in Transwellschalen kultiviert und der Übertritt von FITC-markiertem bovinem Serumalbumin (BSA) durch die Mono-Zellschicht glomerulärer Endothelzellen hindurch nach sechs, 24 und 48 Stunden bestimmt, nachdem die glomerulären Endothelzellen mit 3 µg/ml poly I:C-RNA oder 10 µg/ml poly B-DNA (dA/dT-DNA), jeweils im Komplex mit kationischen Lipiden (CL, Lipofectamine®), oder 6 µg/ml CpG-DNA stimuliert wurden. Die Daten stellen jeweils den Mittelwert von vier unabhängigen Experimenten ± SEM dar. * $p < 0.05$ vs. CL.

Auch hier konnten wir dankenswerterweise mit Herrn Prof. Dr. med. vet. Dr. med. habil. Fritz Krombach und Herrn Dr. med. Christoph Reichel zusammenarbeiten und mittels intravitalmikroskopischer Verfahren den transvaskulären Durchtritt des Polysaccharids FITC-Dextran ermitteln, was Aufschluss über die endotheliale Permeabilität *in vivo* geben sollte (Abbildung 27).

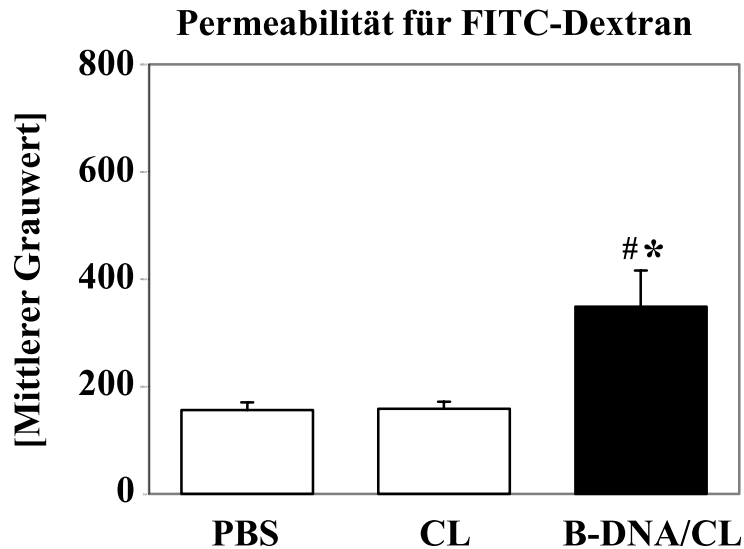


Abbildung 27: Erhöhte Permeabilität für FITC-Dextran *in vivo* nach Injektion von B-DNA/CL-Komplexen. Per Intravitalmikroskopie an Venolen im Musculus cremaster männlicher C57BL/6-Mäuse wurde die ins perivaskuläre Gewebe übergetretene Menge des mit FITC markierten Polysaccharids Dextrans ermittelt. Jeweils vier Mäusen pro Gruppe wurden sechs Stunden zuvor intraskrotal PBS, kationische Lipide (CL) oder Komplexe aus 10 µg B-DNA und kationischen Lipiden (B-DNA/CL) injiziert und 30 Minuten vor der Messung FITC-Dextran. Die Daten stellen jeweils per digitaler Bildanalyse berechnete Werte der Fluoreszenz-Intensität als Mittelwerte \pm SEM dar. # $p < 0.05$ vs. PBS, * $p < 0.05$ vs. CL

Nach Injektionen von B-DNA/CL-Komplexen trat innerhalb von sechs Stunden statistisch signifikant mehr FITC-Dextran in das Interstitium über als bei alleiniger Applikation von PBS oder kationischen Lipiden (CL).

Folglich führten die genannten Nukleinsäuren nicht nur *in vitro* zu einer gesteigerten Albuminpassage durch einschichtige glomeruläre Endothelzellen, sondern dieser Effekt konnte auch *in vivo* für B-DNA-/CL-Komplexe nachgewiesen werden, die eine erhöhte Permeabilität für Dextran bewirkten.

3.8 Auswirkungen der Nukleinsäure-Exposition auf Proliferation und Apoptose

Der kontrollierte Zelltod (Apoptose) ist ein Schutzmechanismus, um die Virusreplikation einzuschränken. Tatsächlich führt endosomale Aktivierung von TLR3 mit viraler dsRNA in Mesangialzellen und anderen Zelltypen zur Apoptose [71, 115]. Ein ähnlicher Effekt bei glomerulären Endothelzellen durch zytosolische Nukleinsäure-Erkennung ist bislang nicht bekannt, sodass im Folgenden der Einfluss von poly I:C-RNA- und B-DNA-Komplexen auf die Proliferationsrate und Apoptose analysiert wurde (Abbildung 28). Außerdem warf die aus Kapitel 3.7 und Abbildung 26 gewonnene Erkenntnis über die Permeabilitätssteigerung der Endothelzellen die Frage danach auf, ob dies möglicherweise auf die Einleitung programmierten Zelltodes zurückzuführen war.

Zunächst wurde mittels des auf Tetrazolium basierenden *CellTiter 96® AQueousOne Solution Cell Proliferation Assay* auf die Proliferation der Zellen geschlossen. Die bei der Addition von Tetrazolium ablaufende Farbreaktion und der daraus resultierende Farbumschlag sind proportional zum Anteil metabolisch aktiver, proliferierender Zellen (siehe auch 2.2.6). Sowohl komplexierte poly I:C-RNA als auch komplexierte B-DNA verlangsamten dosisabhängig die Proliferation der glomerulären Endothelzellen (Abbildung 28A). Die Nukleinsäuren alleine induzierten dagegen keinen Unterschied zur Vergleichsgruppe, so wie auch CpG-DNA und LPS zu keiner Senkung der Proliferation der glomerulären Endothelzellen führten.

Diese Beobachtung könnte auf die Einleitung von Apoptose zurückzuführen sein. Deshalb wurde durchflusszytometrisch der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen nach Stimulation mit poly I:C-RNA oder B-DNA bestimmt. Hierzu wurden die glomerulären Endothelzellen nach 24-stündiger Nukleinsäure-Exposition mit FITC-Annexin-V-Antikörpern und Propidiumiodid (PI) inkubiert. Auf diese Weise lassen sich früh-apoptotische Zellen von spät-apoptotischen, nekrotischen Zellen unterscheiden, denn die alleinige Färbung für Annexin V kennzeichnet den (frühen) Apoptosevorgang, während die doppelt positive Färbung für Annexin V und PI die späte Apoptose und den Zelltod markiert (Abbildung 28B und C).

In keiner Interventionsgruppe zeigte sich statistisch relevanter Unterschied zur entsprechenden Kontrolle.

Offensichtlich senken poly I:C-RNA- und B-DNA-Lipidkomplexe also zwar eindeutig die Proliferation bzw. verlangsamen den Zellmetabolismus glomerulärer Endothelzellen, dieser Effekt beruht jedoch nicht auf der Einleitung des Zelltodes.

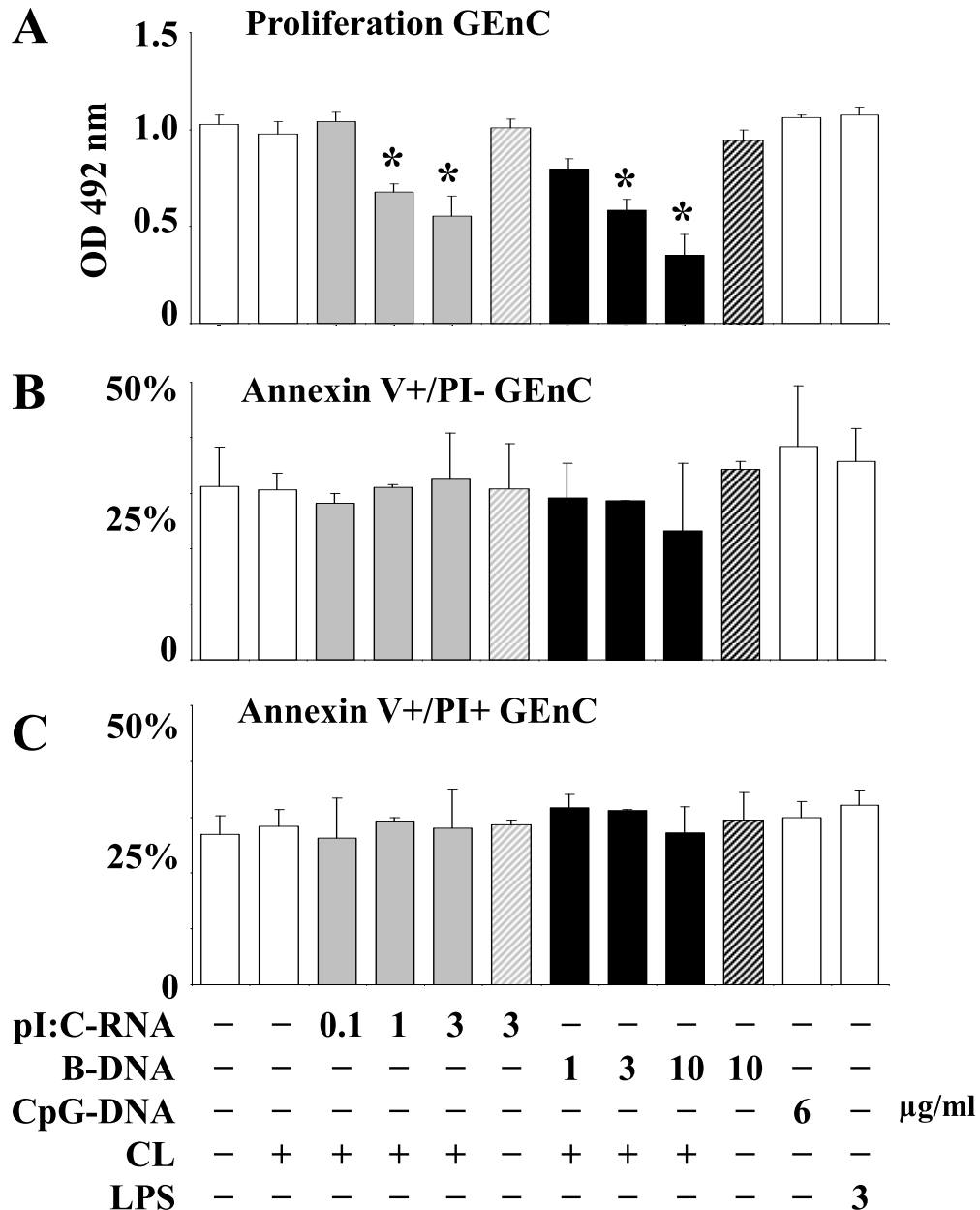


Abbildung 28: Proliferation und Apoptose glomerulärer Endothelzellen (GEnC). GEnC wurden mit den angegebenen Konzentrationen poly I:C-RNA, B-DNA (poly dA/dT-DNA), komplexiert mit kationischem Lipid (CL, Lipofectamine®), CpG-DNA oder LPS stimuliert. **A:** Die Proliferation wurde nach 48 Stunden mittels Biolumineszenz ermittelt, indem spektrophotometrisch der Farbumschlag von Tetrazolium zu Formazan gemessen wurde (Absorption bei 492 nm). Dieser ist proportional zur Anzahl proliferierender Zellen. **B und C:** Der Anteil apoptotischer GEnC wurde durchflusszytometrisch bestimmt, indem früh-apoptotische Zellen (**B**) und spät-apoptotische Zellen (**C**) anhand ihrer Oberflächenexpression von Annexin V und Markierung mit Propidiumiodid (PI) gemessen wurden. Die Daten zeigen jeweils den Mittelwert dreier unabhängiger Experimente \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. Medium.

Diskussion

4 Diskussion

Innerhalb der Gruppe der entzündlichen Nierenerkrankungen bildet die virus-assoziierte Glomerulonephritis eine klinisch relevante Entität. Einerseits können virale Infektionen eine vorbestehende Glomerulonephritis verstärken, wie z.B. bei Lupusnephritis oder IgA-Nephropathie, andererseits können sie eine *de novo* Glomerulonephritis induzieren.

Das Forschungsgebiet der entzündlichen Nierenerkrankungen vereint Erkenntnisse aus der Immunologie mit klinischen Beobachtungen aus dem Bereich der Nephrologie. Daher bietet sich die Gelegenheit, Überschneidungen abzuleiten und Sachverhalte der immunologischen Forschung auf eine nephrologische Problematik zu übertragen. Ähnlich verhält es sich beim Thema der virus-assoziierten Glomerulonephritis. Die virale Immunantwort klassischer Immunzellen wie dendritischer Zellen ist bislang relativ ausführlich untersucht, jedoch sind die Mechanismen der viralen Antigenerkennung bei der viral-getriggerten Glomerulonephritis unklar. Insbesondere ob virale Nukleinsäuren innerhalb der Niere von renalen Zellen erkannt werden und ob neben der systemischen antiviralen Immunantwort eine lokale Ausschüttung inflammatorischer Zytokine sowie antiviral gerichteter Typ-I-Interferone erfolgt, ist nicht geklärt.

Glomeruläre Endothelzellen als luminales Element der glomerulären Filtrationsbarriere stehen direkt mit dem Blut in Kontakt und sind jederzeit Partikeln ausgesetzt, die im Blutstrom zirkulieren. Darunter fallen auch Nukleinsäuren, die im Zuge viraler Infektionen auftreten oder im Rahmen von Systemerkrankungen wie des Lupus erythematoses aus dem eigenen Organismus stammen [46, 82, 105]. Vor rascher Degradation durch RNAsen oder DNAsen sind solche Nukleinsäuren geschützt, wenn sie als an Proteine oder Lipide gebundene Komplexe existieren [88, 138, 173]. So ist dies bei Immunkomplexen der Fall, in deren Form sich Nukleinsäuren entlang des glomerulären Endothels ablagern und dort zu einer inflammatorischen Reaktion (Glomerulonephritis) führen. Die glomeruläre Filtrationsbarriere verliert ihre regelrechte Schrankenfunktion, resultierend in Proteinurie [86, 135].

Die Mechanismen der Nukleinsäure-Erkennung innerhalb der Glomeruli sind bislang nicht identifiziert worden, jedoch weiß man von dendritischen Zellen, dass sie mithilfe von sog. Pathogenerkennungsrezeptoren auf virale RNA oder DNA mit der Ausschüttung inflammatorischer Zytokine und speziell antiviral gerichteter Typ-I-Interferone reagieren, wobei die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors IRF3 einen wichtigen Schritt darstellt [68, 145]. Die eingeleiteten Signalwege sind dabei höchst unterschiedlich und werden über

membranständige Toll-like Rezeptoren (3, 7/8, 9) oder MyD88-unabhängig über zytosolische RNA- oder DNA-bindende Moleküle (RIG-1, MDA5; DAI/ZBP1 und andere bislang unbekannte Sensoren) vermittelt [12, 60, 75, 149].

Da glomeruläre Endothelzellen grundsätzlich in der Lage sind, ein entzündliches Milieu zu erzeugen, indem sie pro-inflammatorische Zytokine synthetisieren und die Transmigration von Leukozyten ermöglichen [120], außerdem über gewisse Toll-like Rezeptoren, nämlich die TLR 1 bis 6, verfügen [116], vermuteten wir, dass glomeruläre Endothelzellen an lokalen inflammatorischen Prozessen im Rahmen einer virus-assoziierten Glomerulonephritis beteiligt sind. Zudem konnte in vorhergehenden Studien unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass eine systemische Applikation der Nukleinsäuren poly I:C-RNA oder B-DNA die Proteinurie nephritischer Mäuse verstärkt [5, 115], wobei ungeklärt ist, ob die Nukleinsäuren auch von glomerulären Endothelzellen erkannt werden und zu einer inflammatorischen Immunantwort im Sinne einer Endothelaktivierung führen.

Wir nahmen also die Hypothese an, dass glomeruläre Endothelzellen virale Nukleinsäuren wahrnehmen und mittels spezifischer (zytosolischer) Rezeptoren der RNA- und DNA-Erkennung eine inflammatorische Immunantwort in Form einer Endothelaktivierung sowie eine antivirale Ausschüttung von Typ-I-Interferon generieren und somit eine wichtige Komponente bei der Pathogenese der virus-assoziierten Glomerulonephritis darstellen. Auf diese Weise könnten glomeruläre Endothelzellen mit lokalen antiviralen Abwehrmechanismen zur viral-induzierten Glomerulonephritis und zum Verlust der Schrankenfunktion und daraus resultierender Proteinurie beitragen.

Die vorliegende experimentelle Arbeit zeigt erstmals, dass glomeruläre Endothelzellen in diese pathogenetische Prozesse involviert sind und durchaus ein Teil einer solchen Immunantwort sein können. Dabei bietet diese Studie diverse *in vitro* vorgenommene Untersuchungen, die durch *in vivo* gewonnene Daten untermauert werden. Umgekehrt leisten die Zellkulturstudien einen nennenswerten Anteil zur Aufklärung molekularer pathogenetischer Mechanismen, die glomeruläre Endothelzellen im Zuge einer viral-getriggerten Glomerulonephritis betreffen. Gleichzeitig stoßen die hier dargelegten Erkenntnisse neue Fragen auf und erlauben in Bezug auf gewisse Sachverhalte keine endgültige Klärung, sodass es höchstwahrscheinlich weiterer Arbeiten bedarf, die zugrundeliegenden Pathomechanismen am Menschen zu verstehen.

4.1 Effekte der Nukleinsäuren auf glomeruläre Endothelzellen

Doppelsträngige poly I:C-RNA und doppelsträngige poly dA/dT-DNA (B-DNA) hatten vielfältige Wirkungen auf die in dieser Arbeit verwendeten, von Dr. Nese Akis aus der ts A58 Immortomaus isolierten, murinen glomerulären Endothelzellen (GEnC) [4].

Zytokinproduktion

In einer dosisabhängigen Weise bewirkten diese Nukleinsäuren nach Komplexierung mit kationischen Lipiden nicht nur die Ausschüttung verschiedener proinflammatorischer Zytokine, nämlich IL-6, CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CXCL10/IP-10, sondern auch die Synthese von antiviralem Typ-I-Interferon, d.h. Interferon α und Interferon β . Besonders fällt auf, dass das Typ-I-Interferon als spezifische Reaktion auf die Nukleinsäuren vermehrt produziert wird, nicht jedoch als Antwort auf das bakterielle Lipopolysaccharid. Diese Zytokine und Chemokine könnten zu einem lokalen inflammatorischen Milieu beitragen, infolgedessen es zu Leukozytenrekritierung und entzündlichen Veränderungen kommen könnte, die sich in der klinischen Ausprägung einer virus-assoziierten Glomerulonephritis äußern. Das nach Aktivierung des Inflammasomkomplexes ausgeschüttete Zytokin IL-1 β wurde von den glomerulären Endothelzellen nicht synthetisiert und scheint hier offensichtlich keine wichtige Funktion einzunehmen.

Aufnahmewege in die glomeruläre Endothelzelle

Hohe Dosen der doppelsträngigen RNA poly I:C aktivieren Immunzellen und murine oder humane Endothelzellen über membranständige Toll-like Rezeptoren [34, 37, 94, 142, 156], aber bereits deutlich geringere Konzentrationen vermochten eine Immunantwort der glomerulären Endothelzellen auszulösen. Vorausgesetzt, die Nukleinsäuren gelangten mittels kationischer Lipide in das Zytosol. Besondere Bedeutung hatte also die Komplexierung der Nukleinsäuren mit kationischem Lipid. Offenbar begünstigt dies den Transmembrantransport und befördert Nukleinsäuren in das Zytosol. Konfokalmikroskopisch konnte dieser Vorgang anhand rhodaminmarkierter B-DNA aufgezeigt und bestätigt werden, indem die markierte

B-DNA nur dann nach mehreren Waschvorgängen in den Zellen zu detektieren war, wenn die DNA vorher mit kationischem Lipid komplexiert worden war.

Da die intrazelluläre Nukleinsäure-Aufnahme mit Chlorpromazin vollständig blockiert werden konnte, hängt diese bei glomerulären Endothelzellen offensichtlich von Clathrin-vermittelter Endozytose ab. Dieser Transportmechanismus wurde auch für den intrazellulären Einschluss doppelsträngiger RNA durch *Drosophila-melanogaster*-S2-Zellen [134] sowie von poly I:C-RNA durch humane embryonische Nierenzellen 293 (embryonic kidney 293 cells) [61] als entscheidend charakterisiert.

Endosomale Toll-like Rezeptoren übernehmen bei glomerulären Endothelzellen keine Funktion in der Erkennung von Nukleinsäuren. Zum einen exprimieren sie lediglich den für doppelsträngige RNA spezifischen Toll-like Rezeptor 3 [116], zum anderen konnten wir eine Beteiligung endosomaler Rezeptoren ausschließen, da auch nach Anwendung von Chloroquin und Cytochalasin D keinerlei Reduktion der Chemokinproduktion zu beobachten war. Chloroquin fungierte hierbei als Hemmstoff der endosomalen Ansäuerung, Cytochalasin D als Phagozytose-Inhibitor [61].

Auch das Adapterprotein MyD88 spielte keine entscheidende Rolle bei der Aktivierung glomerulären Endothels durch doppelsträngige RNA und B-DNA, woraus der Schluss gezogen werden kann, dass Toll-like Rezeptoren der IL-1-Rezeptor-Familie nicht für die Auslösung der inflammatorischen Endothelantwort in Betracht kommen.

Das bedeutet, dass für die Erkennung von Nukleinsäuren zytosolische Rezeptoren von deutlich größerer Bedeutung sind. Wichtige Erkenntnisse in Bezug auf diesen Signalweg brachten die Studien des Gen-Knockdowns der RIG-like Rezeptoren RIG-1 und MDA5 sowie des bislang einzig bekannten DNA-Sensors DAI/ZBP1 hervor.

Intrazellulärer Signalweg

Interessanterweise verläuft die durch poly I:C-RNA-Komplexe eingeleitete Signalkaskade in glomerulären Endothelzellen über RIG-1, nicht jedoch über MDA5. Die Gewichtung innerhalb der zytosolischen RIG-like Rezeptoren RIG-1 und MDA5 bei der Erkennung doppelsträngiger RNA scheint in unterschiedlichen Zelltypen stark zu divergieren und auch von der Art der RNA abzuhängen, obwohl RIG-1 und MDA5 strukturell einige Homologien aufweisen [174]. Der hier mittels siRNA erhobene Befund weicht von Untersuchungen an embryonalen Mausfibroblasten, dendritischen Zellen [68] und Mesangialzellen [38] ab, in

denen MDA5 den Schwerpunkt der intrazellulären RNA-Wahrnehmung bildete. Allerdings beruht die Erkennung von poly I:C-RNA in humanen Mesothelialzellen rein auf RIG-1 [170], in humanen Keratinozyten gleichermaßen auf RIG-1 und MDA5 [66], während hier in glomerulären Endothelzellen poly I:C-RNA bevorzugt an RIG-1 bindet.

Hinsichtlich der Signalkaskade bei der Wahrnehmung von doppelsträngiger DNA muss die Frage nach dem Rezeptor in glomerulären Endothelzellen offen bleiben. Der DNA-Sensor DAI/ZBP1 wird von glomerulärem Endothel zwar exprimiert, übernimmt allerdings keine Aufgabe bei der durch B-DNA initiierten Aktivierung. Dieser Sachverhalt passt zu den in der Literatur geäußerten Vermutungen, dass DAI/ZBP1 nicht von entscheidender Wichtigkeit bei der Erkennung von B-DNA sein könnte. Zwar fungiert DAI/ZBP1 als zytosolischer Sensor für DNA, wie Takaoka et al. an murinen L929-Fibroblasten untersucht haben [149], jedoch konnte in DAI/ZBP1-defizienten Knock-Out-Mäusen keine entsprechende phänotypische Korrelation hergestellt werden [166]. Der Erkennungsmechanismus für B-DNA bleibt also in Zukunft noch zu klären. Auch der DNA-Sensor der durch das Inflammasom induzierten Interferonausschüttung ist nicht identifiziert [109], immerhin scheint das Inflammasom ein bedeutender Faktor in der Abwehr von B-DNA zu sein, indem es in dendritischen Zellen eine Ausschüttung von Interleukin-1 β bewirkt [55, 131]. Da glomeruläre Endothelzellen keinerlei Interleukin-1 β nach Stimulation mit B-DNA produzierten, spielt dieser Mechanismus hier offensichtlich nur eine untergeordnete Rolle.

4.2 Effekte ausgeschütteten Typ-I-Interferons auf Glomeruläre Endothelzellen

Induktion der Expression von Nukleinsäure-Rezeptoren

Typ-I-Interferon als antiviral wirksames Zytokin erfüllt unter anderem die Aufgabe, Zellen der Blutzirkulation und in der Umgebung einer Virusinfektion für die Detektierung von viralen Antigenen zu sensibilisieren [154]. Dazu gehört auch die Steigerung der Expression von relevanten Rezeptoren, die der Erkennung von Nukleinsäuren dienen. Wir machten uns diese Eigenschaft hier zu Nutze, um die Existenz solcher Rezeptoren in glomerulären Endothelzellen unter basalen Bedingungen und nach Stimulation mit Interferon β zu vergleichen. Dabei offenbarte sich die Grundvoraussetzung zu allen nachfolgenden Studien, nämlich das Vorhandensein von TLR3, RIG-1, MDA5 und IPS-1 als involvierte Moleküle der RNA-induzierten Immunreaktion sowie DAI/ZBP1 als einzig bisher entdeckter zytosolischer

Sensor für DNA. Besonders nach Einwirkung von Interferon β waren die zugehörigen mRNA-Transkripte bzw. die Proteine deutlich mittels quantitativer real-time RT-PCR und Western Blot nachzuweisen. Darüber hinaus war auch der phosphorylierte, also aktivierte, IRF3 stark synthetisiert, der einen wichtigen Transkriptionsfaktor für Typ-I-Interferon darstellt und gemeinsam mit IRF7 die Interferonsynthese in dendritischen Zellen anregt [68, 145]. Aus diesem Grund, und weil in dendritischen und mesangialen Zellen ein positiver Rückkopplungsmechanismus durch Typ-I-Interferon beschrieben worden ist (s.u.), untersuchten wir dieses Phänomen der Aktivierungsschleife in glomerulären Endothelzellen.

Kein positiver autokrin-parakriner Rückkopplungsmechanismus durch Typ-I-Interferon

Die lokale Ausschüttung von Typ-I-Interferon durch plasmazytoide dendritische Zellen besitzt parakrine und autokrine Effekte auf die pDC, die die immunologische Reaktion der pDC im Sinne einer positiven Rückkopplung noch verstärken [41, 51, 53, 99, 122, 154].

Studien aus unserer Arbeitsgruppe an Mesangialzellen zeigten, dass diese mit einer starken Produktion von Typ-I-Interferon auf poly I:C-RNA reagierten, das zudem eine positive autokrine und parakrine Verstärkung in Gang setzte, die zur weiteren Synthese von Zytokinen und Chemokinen führte [38]. Ein ähnlicher Vorgang in glomerulären Endothelzellen war nach Einsatz von Antikörpern, die das endogen ausgeschüttete Typ-I-Interferon neutralisierten, jedoch nicht festzustellen: Die Synthese von CXCL10/IP-10 blieb nach Einsatz der Antikörper unverändert. Exogen hinzugeführtes Interferon β bewirkte auch keinerlei Chemokinantwort in Form von CCL2/MCP-1 oder CCL5/RANTES und nur eine geringe Steigerung der Konzentration von CXCL10/IP-10, obgleich diese Chemokine auf Transkriptionsniveau in geringem Umfang induziert wurden. Typ-I-Interferon stärkte jedoch sehr wohl die Expression von relevanten Pathogenerkennungsrezeptoren, was sowohl auf Ebene der Transkription als auch auf Proteinebene nachgewiesen wurde. Das legt den Schluss nahe, dass glomeruläre Endothelzellen zwar deutlich mit der Synthese von proinflammatorischen Zytokinen und Typ-I-Interferon auf die direkte Exposition gegenüber Nukleinsäuren reagieren, jedoch trotz heraufregulierter Rezeptorexpression nicht zu einer Maximierung der Mediatorantwort durch lokal in der Umgebung befindliches Typ-I-Interferon stimuliert werden.

Interferonstimulierte Gene

Zu den durch Typ-I-Interferon aktivierten Interferon-stimulierten Genen gehören verschiedenste Immunregulatoren und antiviral wirksame Effektoren [133, 154]. Glomeruläre Endothelzellen exprimieren die GTPase MX1, welche virale Ribonucleoproteine (RNP) abbaut [40]. Des weiteren führen Interferonstimulierte Gene mittels der Ribonuklease RNase L zur Degradierung intrazellulär gelegener viraler RNA [12] und auch zelleigener RNA, sodass diese kleinen RNA-Fragmente über die zytosolischen Rezeptoren RIG-1 und MDA5 eine verstärkte Typ-I-Interferonausschüttung veranlassen [98].

Folglich scheinen glomeruläre Endothelzellen an der Initiierung der antiviralen Immunantwort involviert zu sein, jedoch ist nicht eindeutig ersichtlich, ob sie wesentlich an einer dauerhaften Aufrechterhaltung derselben beteiligt sind.

4.3 Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen und Leukozytenmigration

Unter all den oben beschriebenen inflammatorischen Chemokinen, die von glomerulären Endothelzellen nach Exposition gegenüber poly I:C-RNA- und B-DNA-Komplexen produziert werden, ist CXCL10/IP-10 von herausragender Bedeutung. Es wird von Interferon induziert und wirkt als chemotaktisches Zytokin für Makrophagen, dendritische Zellen, NK-Zellen und insbesondere für zytotoxische T-Zellen, deren Adhäsion an das Endothel es über den Chemokinrezeptor CXCR3 fördert [57, 121]. Dieser Vorgang unterstützt die antivirale Immunantwort, deren Ziel es ist, eine weitere Virusreplikation zu verhindern, indem virusinfizierte Zellen direkt getötet werden. Andererseits erzeugt das entzündliche Milieu die glomeruläre Inflammation mit begleitender klinischer Symptomatik. Außerdem wird die Leukozytentransmigration nach bakterieller Antigenexposition, speziell die feste leukozytäre Adhäsion an das Endothel, wesentlich durch die Oberflächenexpression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 unterstützt, so auch in aktiviertem Nierenendothel [171] und glomerulärem Endothel bei Poststreptokokken-Glomerulonephritis [125].

Dieser komplexe Prozess erfordert einen fein koordinierten Ablauf von Leukozytenanlagerung und rolling mithilfe von Selektin sowie einer chemokinvermittelten Aktivierung der leukozytären Integrine, was nachfolgend die feste Adhäsion zwischen endothelialen Adhäsionsmolekülen und Leukozyten-Integrinen erzeugt [16, 120].

Zwar ergaben die *in vitro* durchgeführten durchflusszytometrischen Experimente an den

glomerulären Endothelzellen nur eine geringere Steigerung der Oberflächenexpression von ICAM-1 und VCAM-1 nach Nukleinsäure-Exposition, wenn man den Vergleich mit Endotoxin (LPS) heranzieht. Jedoch stellen die freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. med. vet. Dr. med. habil. Fritz Krombach und Herrn Dr. med. Christoph Reichel am Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin mit uns in Kooperation durchgeführten intravitalmikroskopischen Studien an Endothel eine Beziehung zwischen der Exposition von doppelsträngiger B-DNA und der festen Leukozytenadhäsion und der Leukozytenmigration her. Diese Beobachtung war dabei auf die Funktion von ICAM-1 zurückzuführen, wie die Anwendung von ICAM-1-neutralisierenden Antikörpern zeigte, die die Nukleinsäure-vermittelten Effekte nahezu vollständig aufhob.

In Zusammenschau mit der oben beschriebenen Zytokinproduktion durch glomeruläre Endothelzellen könnte hier also auf doppelte Weise die Rekrutierung von Leukozyten erfolgen: zunächst über die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine und anschließend über die Vermittlung der leukozytären Adhäsion und Transmigration.

4.4 Albuminpermeabilität und Zellproliferation

Die Nukleinsäure-Exposition hatte auch funktionelle Konsequenzen auf die Barrierefunktion der glomerulären Endothelzellen. Sowohl doppelsträngige B-DNA als auch poly I:C-RNA erhöhten die Permeabilität für Albumin durch eine einschichtige Lage glomerulärer Endothelzellen deutlich, was zur Proteinurie bei virusassoziierten Glomerulonephritiden beisteuern könnte. Außerdem könnte die gesteigerte Durchlässigkeit die Clearance von viralen Partikeln über den Urin unterstützen, sodass die höhere Permeabilität gleichzeitig Ausdruck pathologischer Prozesse sein, aber auch eine Limitation der Antigenexposition herbeiführen könnte. Hier lassen sich die *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse auf *in vivo* befindliche Vorgänge übertragen, wie die in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. med. vet. Dr. med. habil. Fritz Krombach und Herrn Dr. med. Christoph Reichel am Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin durchgeführten intravitalmikroskopischen Endothelstudien zeigen konnten: die Injektion von B-DNA-Komplexen mit kationischen Lipiden induzierte an der lebenden Maus eine große Durchlässigkeit für Dextran ins Interstitium.

Wie dieser Vorgang auf zellbiologischer Ebene genau von statten geht, müssen zukünftige Studien noch zeigen. Möglicherweise kommt es zur Auflockerung von Zellkontakten, ein

Mechanismus, der für doppelsträngige RNA an brain microvascular endothelial cells (mikrovaskulären Hirnendothelzellen) von Fischer et. al untersucht wurde [37]. Dort kam es *in vitro* und *in vivo* nach Hinzugabe von poly I:C-RNA zu einer Auflösung der tight junctions (Zonulae occludentes) und somit zu einer gesteigerten transendothelialen Permeabilität.

Eine andere mögliche Erklärung könnte die Einleitung von Apoptose sein. Darunter versteht man den Vorgang des programmierten Zelltods, der ein immunologisches Instrument darstellt, die virale Verbreitung zu begrenzen. Dabei geht die Zelle kontrolliert zugrunde und schrumpft, nachdem eine Reihe von Nucleasen, Proteasen und anderen Enzymen sämtliche Zellkomponenten abgebaut hat. Im Gegensatz dazu steht die Nekrose, die den unkoordinierten Zelluntergang beschreibt und eine Immunantwort über unkontrolliert freigesetzte Bestandteile der toten Zelle noch verstärkt [19, 80].

Jedoch lösten weder poly I:C-RNA- noch B-DNA-Komplexe in den durchflusszytometrischen Untersuchungen zu Annexin V einen kontrollierten Zelltod oder eine Nekrose aus, obgleich die Proliferationsrate der glomerulären Endothelzellen stark abnahm. Doch wurde die letztgenannte Beobachtung an subkonfluenten Zellen gewonnen, außerdem könnte diese Endothelzelldysfunktion durch die Tatsache bedingt sein, dass es sich um Endothelzellen einer immortalisierten Zelllinie handelt, statt um primäre glomeruläre Endothelzellen. Die Verwendung eines Inhibitors gegen Caspase-8, einem bei der Einleitung von Apoptose beteiligten Enzym, brachte keinen wesentlichen Unterschied in der Zellproliferation, sodass die Frage nach der Ursache für den gesenkten Zellmetabolismus glomerulären Endothels durch Nukleinsäuren offen bleiben muss.

Die gesenkte Proliferationsrate könnte allerdings auch unter dem Gesichtspunkt der antiviralen Immunreaktion durch Typ-I-Interferon zu werten sein, da dieses eine antiproliferative Wirkung entfaltet [97, 119], um der weiteren Virenreplikation entgegenzuwirken. Dieser Befund passt zur histopathologischen Beurteilung der virusassoziierten Glomerulonephritiden, die im Gegensatz zur bakteriell bedingten Entzündung weniger mit Endothelzellproliferation einhergehen als vielmehr mit mesangialer Verbreiterung, wie es bei Hepatitis-C-Virus-assoziierten Glomerulonephritiden der Fall ist. Tatsächlich konnte für Mesangialzellen in Studien unserer Arbeitsgruppe eine gesteigerte Proliferationsrate durch B-DNA und Triphosphat-RNA beobachtet werden [6]. Offensichtlich haben Nukleinsäuren in unterschiedlichen Zelltypen auch unterschiedliche Auswirkungen auf deren Zellzyklus.

4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass doppelsträngige poly I:C-RNA und poly dA/dT-DNA (B-DNA) nach intrazellulärer Aufnahme zu einer Aktivierung glomerulärer Endothelzellen führen, die sich in der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, Chemokine und von Typ-I-Interferon äußert, indem MyD88-unabhängige Signalwege angestoßen werden. Diese glomerulär-endotheliale Immunantwort umfasst außerdem die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1, eine gesteigerte Permeabilität für Albumin sowie eine gesenkte Proliferationsrate der glomerulären Endothelzellen.

Selbstverständlich können nicht alle aufgeworfenen Fragen letztendlich geklärt werden. Eine der Hauptursachen liegt vermutlich darin, dass es sich bei den hier verwendeten glomerulären Endothelzellen um eine immortalisierte Zelllinie handelt statt um primär isoliertes glomeruläres Endothel. Diese Tatsache stellt vermutlich eine der wesentlichen Limitationen dieser Studie dar, da nicht bekannt ist, inwieweit die erhobenen Daten auf Vorgänge beim Menschen übertragbar sind. Außerdem sind einige Experimente von eher artifiziellem Versuchsaufbau, was in der Natur einer Zellkulturstudie begründet liegt. Immerhin wurde – soweit möglich – versucht, die in dieser Arbeit *in vitro* erhobenen Daten, auch *in vivo* zu analysieren und auf diese Weise eine verlässliche Beziehung zu den intravital stattfindenden pathogenetischen Mechanismen herzustellen. Dies gelang für die wichtigen Prozesse der Leukozytenrekrutierung und –transmigration sowie für die Steigerung der Permeabilität für globuläre Proteine wie Albumin oder hochmolekulare Polysaccharide wie Dextran.

All diese Faktoren stellen Mechanismen dar, die bei einer viral-getriggerten Glomerulonephritis oder Lupusnephritis zu einer lokalen entzündlichen Reaktion innerhalb des Glomerulus, direkt an der glomerulären Filtrationsbarriere führen können und zur klinischen Symptomatik eines nephrotischen Syndroms. Glomeruläre Endothelzellen sind höchstwahrscheinlich nur ein Bestandteil dieser inflammatorischen Vorgänge, die erst im komplexen Zusammenspiel mit benachbarten renalen Zellen und mit lokalen klassischen Immunzellen entstehen.

Zusammenfassung

5 Zusammenfassung

Die vorliegende experimentelle Arbeit befasst sich mit den Pathomechanismen einer viral getriggerten Glomerulonephritis und mit der Rolle der glomerulären Endothelzellen im Speziellen. Virale Infektionen sind oftmals mit einer verstärkten Aktivität einer bestehenden Glomerulonephritis verbunden oder können gar eine *de novo* Glomerulonephritis induzieren, wobei die Prozesse, die zu einer solchen virusassoziierten Entzündungsreaktion führen, weitestgehend ungeklärt sind. Vorarbeiten aus der eigenen Arbeitsgruppe zeigten, dass virale doppelsträngige RNA sowie nicht-CpG-DNA (sog. doppelsträngige B-DNA) eine Immunkomplex-Glomerulonephritis verstärken, indem sie die systemische Produktion von Typ-I-Interferon, die B-Zell-Proliferation, die Hemmung regulatorischer T-Zellen und eine Entzündungsreaktion im Glomerulus bewirken. Außerdem sind von dendritischen Zellen diverse Mechanismen der angeborenen Immunität zur Detektierung von Nukleinsäuren bekannt, die in einer Zytokin- und Interferonantwort münden. Dabei spielen neben membranständigen und endosomalen Toll-like Rezeptoren insbesondere die intrazellulär gelegenen zytosolischen Rig-like Rezeptoren RIG-1 und MDA5 eine besondere Rolle bei der RNA-Erkennung, während DAI/ZBP1 und andere, bisher unentdeckte Sensoren, die Wahrnehmung von DNA übernehmen. Ob zusätzlich zur systemischen auch eine lokale spezifisch-antivirale Immunantwort zur glomerulären Entzündung beiträgt, ist unbekannt. Wir untersuchten daher, ob glomeruläre Endothelzellen (GEnC) virale doppelsträngige RNA oder DNA erkennen und antivirale Zytokine produzieren oder mit endotheltypischen Vorgängen wie einer Permeabilitätsänderung oder einer erhöhten Expression von Oberflächenmolekülen reagieren, die zur Leukozytenrekrutierung dienen.

Immortalisierte murine glomeruläre Endothelzellen exprimieren ein mäßiges Spektrum an Toll-like Rezeptoren, nämlich TLR 1 bis 6, sowie die RIG-like Rezeptoren RIG-1 und MDA5, außerdem den bisher bekannten DNA-Sensor DAI/ZBP1. Die verwendeten doppelsträngigen poly I:C-RNA und poly dA/dT-DNA (B-DNA) wurden nur dann intrazellulär aufgenommen, sofern diese mit einem kationischen Lipid komplexiert waren. Dieser Prozess war durch Chlorpromazin, nicht aber durch Cytochalasin D oder Methyl- β -Cyclodextrin zu blockieren, und daher über Clathrin-abhängige Endozytose vermittelt. Sowohl poly I:C-RNA als auch B-DNA bewirkten in glomerulären Endothelzellen die Ausschüttung von IL-6, CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CXCL10/IP-10 sowie Interferon α und β , wobei das Toll-like-Rezeptor-Adapterprotein MyD88 offenbar keine wichtige Rolle in der Signalkaskade einnahm.

Stattdessen verlief die Erkennung der doppelsträngigen poly I:C-RNA über intrazellulär lokalisierte Rezeptoren. Studien mit short interfering RNA (siRNA) wiesen darauf hin, dass der RIG-like Rezeptor RIG-1, nicht jedoch MDA5, hierbei von entscheidender Relevanz ist. Der Rezeptor für B-DNA konnte ähnlich wie in einigen anderen Veröffentlichungen nicht ausgemacht werden, der einzig bekannte mutmaßliche zytosolische DNA-Sensor DAI/ZBP1 spielte keine Rolle bei der inflammatorischen Reaktion durch glomeruläre Endothelzellen. Die Ausschüttung von Typ-I-Interferon führte nicht zu einer autokrin-parakrinen Aktivierung im Sinne einer positiven Rückkopplungsschleife, wie sie für dendritische Zellen oder Mesangialzellen beschrieben ist. Sowohl poly I:C-RNA als auch B-DNA induzierten die Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1 und erhöhten die Permeabilität für FITC-Albumin durch eine einlagige Schicht glomerulärer Endothelzellen.

Die genannten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass mit kationischen Lipiden komplexierte virale doppelsträngige RNA und B-DNA glomeruläre Endothelzellen direkt über intrazelluläre Pathogenerkennungsrezeptoren zur Produktion von Typ I Interferonen, proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen aktivieren können. Hierbei wird doppelsträngige RNA durch RIG-I erkannt, der zytosolische Rezeptor für B-DNA bleibt unbekannt. Zusätzlich unterstützen Adhäsionsmoleküle die Leukozytenrekrutierung und eine erhöhte Permeabilität die Clearance von viralen Partikeln über den Urin. Diese lokalen antiviralen Mechanismen würden so zum klinischen Bild der viral induzierten Glomerulonephritis beitragen.

Literaturangaben

6 Literaturangaben

1. Ablasser, A., et al., *RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate*. Nat Immunol, 2009. 10(10): p. 1065-72.
2. Akira, S., *Toll receptor families: structure and function*. Semin Immunol, 2004. 16(1): p. 1-2.
3. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, 2006. 124(4): p. 783-801.
4. Akis, N. and M.P. Madaio, *Isolation, culture, and characterization of endothelial cells from mouse glomeruli*. Kidney Int, 2004. 65(6): p. 2223-7.
5. Allam, R., et al., *Viral 5'-triphosphate RNA and non-CpG DNA aggravate autoimmunity and lupus nephritis via distinct TLR-independent immune responses*. Eur J Immunol, 2008. 38(12): p. 3487-98.
6. Allam, R., et al., *Viral RNA and DNA trigger common antiviral responses in mesangial cells*. J Am Soc Nephrol, 2009. 20(9): p. 1986-96.
7. Anders, H.J., *Innate pathogen recognition in the kidney: toll-like receptors, NOD-like receptors, and RIG-like helicases*. Kidney Int, 2007. 72(9): p. 1051-6.
8. Anders, H.J., *Toll-like receptors and danger signaling in kidney injury*. J Am Soc Nephrol, 2010. 21(8): p. 1270-4.
9. Anders, H.J., J. Lichtnekert, and R. Allam, *Interferon-alpha and -beta in kidney inflammation*. Kidney Int, 2010. 77(10): p. 848-54.
10. Anders, H.J. and D.A. Muruve, *The inflammasomes in kidney disease*. J Am Soc Nephrol, 2011. 22(6): p. 1007-18.
11. Arya, M., et al., *Basic principles of real-time quantitative PCR*. Expert Rev Mol Diagn, 2005. 5(2): p. 209-19.
12. Baccala, R., et al., *TLR-dependent and TLR-independent pathways of type I interferon induction in systemic autoimmunity*. Nat Med, 2007. 13(5): p. 543-51.
13. Bhimma, R. and H.M. Coovadia, *Hepatitis B virus-associated nephropathy*. Am J Nephrol, 2004. 24(2): p. 198-211.
14. Bhoj, V.G. and Z.J. Chen, *Ubiquitylation in innate and adaptive immunity*. Nature, 2009. 458(7237): p. 430-7.
15. Böcker, W., H. Denk, and P. Heitz, *Pathologie*. Urban & Fischer, 2004. 3. Auflage.
16. Bromley, S.K., T.R. Mempel, and A.D. Luster, *Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic*. Nat Immunol, 2008. 9(9): p. 970-80.
17. Burnette, W.N., *"Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A*. Anal Biochem, 1981. 112(2): p. 195-203.
18. Cao, Y., et al., *Detection of the hepatitis C virus antigen in kidney tissue from infected patients with various glomerulonephritis*. Nephrol Dial Transplant, 2009. 24(9): p.

- 2745-51.
19. Chen, G.Y. and G. Nunez, *Sterile inflammation: sensing and reacting to damage*. Nat Rev Immunol, 2010. 10(12): p. 826-37.
20. Chiu, Y.H., J.B. Macmillan, and Z.J. Chen, *RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway*. Cell, 2009. 138(3): p. 576-91.
21. Classen M., D.V.u.K.K., *Innere Medizin*. Urban & Fischer, 2003.
22. Couser, W.G., *Basic and translational concepts of immune-mediated glomerular diseases*. J Am Soc Nephrol, 2012. 23(3): p. 381-99.
23. Creagh, E.M. and L.A. O'Neill, *TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity*. Trends Immunol, 2006. 27(8): p. 352-7.
24. Cullen, B.R., *RNA interference: antiviral defense and genetic tool*. Nat Immunol, 2002. 3(7): p. 597-9.
25. D'Agati, V. and G.B. Appel, *HIV infection and the kidney*. J Am Soc Nephrol, 1997. 8(1): p. 138-52.
26. Deen, W.M., *What determines glomerular capillary permeability?* J Clin Invest, 2004. 114(10): p. 1412-4.
27. di Belgiojoso, G.B., F. Ferrario, and N. Landriani, *Virus-related glomerular diseases: histological and clinical aspects*. J Nephrol, 2002. 15(5): p. 469-79.
28. Diebold, S.S., et al., *Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA*. Science, 2004. 303(5663): p. 1529-31.
29. DSO, *Deutsche Stiftung Organtransplantation, Koordinierungsstelle Organspende*. <http://www.dso.de/>, 2011.
30. Engvall, E., K. Jonsson, and P. Perlmann, *Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes*. Biochim Biophys Acta, 1971. 251(3): p. 427-34.
31. Engvall, E. and P. Perlmann, *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G*. Immunochemistry, 1971. 8(9): p. 871-4.
32. FACSLab, U.M., *Was ist Durchflußzytometrie*. <http://www.facslab.toxikologie.uni-mainz.de/zytometrie.jsp>.
33. Fairhurst, A.M., et al., *Systemic IFN-alpha drives kidney nephritis in B6.Sle123 mice*. Eur J Immunol, 2008. 38(7): p. 1948-60.
34. Faruqi, T.R. and P.E. DiCorleto, *IFN-gamma inhibits double-stranded RNA-induced E-selectin expression in human endothelial cells*. J Immunol, 1997. 159(8): p. 3989-94.
35. Felgner, P.L., et al., *Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. 84(21): p. 7413-7.
36. Feng, B., et al., *Effect of interferon-alpha-based antiviral therapy on hepatitis C virus-associated glomerulonephritis: a meta-analysis*. Nephrol Dial Transplant, 2012. 27(2): p. 640-6.
37. Fischer, S., et al., *Extracellular RNA mediates endothelial-cell permeability via*

- vascular endothelial growth factor*. *Blood*, 2007. 110(7): p. 2457-65.
38. Flur, K., et al., *Viral RNA induces type I interferon-dependent cytokine release and cell death in mesangial cells via melanoma-differentiation-associated gene-5: Implications for viral infection-associated glomerulonephritis*. *Am J Pathol*, 2009. 175(5): p. 2014-22.
 39. Frei, U., Schober-Halstenberg, H.-J., *Nierenersatztherapie in Deutschland. QuaSi-Niere Jahresbericht 2006/2007*, Berlin. 2008.
 40. Garcia-Sastre, A. and C.A. Biron, *Type I interferons and the virus-host relationship: a lesson in detente*. *Science*, 2006. 312(5775): p. 879-82.
 41. Gautier, G., et al., *A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells*. *J Exp Med*, 2005. 201(9): p. 1435-46.
 42. Gillet, M., W. Cao, and Y.J. Liu, *Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases*. *Nat Rev Immunol*, 2008. 8(8): p. 594-606.
 43. Glassock, R.J., *Immune complex-induced glomerular injury in viral diseases: an overview*. *Kidney Int Suppl*, 1991. 35: p. S5-7.
 44. Hacker, H. and M. Karin, *Regulation and function of IKK and IKK-related kinases*. *Sci STKE*, 2006. 2006(357): p. re13.
 45. Hacker, H., et al., *Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6*. *Nature*, 2006. 439(7073): p. 204-7.
 46. Haraldsson, B., J. Nystrom, and W.M. Deen, *Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria*. *Physiol Rev*, 2008. 88(2): p. 451-87.
 47. Heil, F., et al., *Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8*. *Science*, 2004. 303(5663): p. 1526-9.
 48. Hemmi, H., et al., *A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA*. *Nature*, 2000. 408(6813): p. 740-5.
 49. Hemmi, H., et al., *Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway*. *Nat Immunol*, 2002. 3(2): p. 196-200.
 50. Hochrein, H., et al., *Herpes simplex virus type-1 induces IFN-alpha production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(31): p. 11416-21.
 51. Honda, K., et al., *Selective contribution of IFN-alpha/beta signaling to the maturation of dendritic cells induced by double-stranded RNA or viral infection*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(19): p. 10872-7.
 52. Honda, K., et al., *IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses*. *Nature*, 2005. 434(7034): p. 772-7.
 53. Honda, K., A. Takaoka, and T. Taniguchi, *Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors*. *Immunity*, 2006. 25(3): p. 349-60.
 54. Hornung, V., et al., *5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I*. *Science*, 2006. 314(5801): p. 994-7.
 55. Hornung, V., et al., *AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-*

- activating inflammasome with ASC*. Nature, 2009. 458(7237): p. 514-8.
56. Hornung, V. and E. Latz, *Intracellular DNA recognition*. Nat Rev Immunol, 2010. 10(2): p. 123-30.
 57. Hsieh, M.F., et al., *Both CXCR3 and CXCL10/IFN-inducible protein 10 are required for resistance to primary infection by dengue virus*. J Immunol, 2006. 177(3): p. 1855-63.
 58. Isaacs, A. and J. Lindenmann, *Virus interference. I. The interferon*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1957. 147(927): p. 258-67.
 59. Isaacs, F.J., D.J. Dwyer, and J.J. Collins, *RNA synthetic biology*. Nat Biotechnol, 2006. 24(5): p. 545-54.
 60. Ishii, K.J., et al., *A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA*. Nat Immunol, 2006. 7(1): p. 40-8.
 61. Itoh, K., et al., *The clathrin-mediated endocytic pathway participates in dsRNA-induced IFN-beta production*. J Immunol, 2008. 181(8): p. 5522-9.
 62. Jeansson, M. and B. Haraldsson, *Glomerular size and charge selectivity in the mouse after exposure to glucosaminoglycan-degrading enzymes*. J Am Soc Nephrol, 2003. 14(7): p. 1756-65.
 63. Jeansson, M. and B. Haraldsson, *Morphological and functional evidence for an important role of the endothelial cell glycocalyx in the glomerular barrier*. Am J Physiol Renal Physiol, 2006. 290(1): p. F111-6.
 64. Johnson, R.J., et al., *Membranoproliferative glomerulonephritis associated with hepatitis C virus infection*. N Engl J Med, 1993. 328(7): p. 465-70.
 65. Johnston, B. and E.C. Butcher, *Chemokines in rapid leukocyte adhesion triggering and migration*. Semin Immunol, 2002. 14(2): p. 83-92.
 66. Kalali, B.N., et al., *Double-stranded RNA induces an antiviral defense status in epidermal keratinocytes through TLR3-, PKR-, and MDA5/RIG-I-mediated differential signaling*. J Immunol, 2008. 181(4): p. 2694-704.
 67. Kato, H., et al., *Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response*. Immunity, 2005. 23(1): p. 19-28.
 68. Kato, H., et al., *Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses*. Nature, 2006. 441(7089): p. 101-5.
 69. Kato, H., et al., *Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5*. J Exp Med, 2008. 205(7): p. 1601-10.
 70. Kaufman, L., S.E. Collins, and P.E. Klotman, *The pathogenesis of HIV-associated nephropathy*. Adv Chronic Kidney Dis, 2010. 17(1): p. 36-43.
 71. Kaufman, R.J., *Double-stranded RNA-activated protein kinase mediates virus-induced apoptosis: a new role for an old actor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(21): p. 11693-5.
 72. Kawai, T. and S. Akira, *Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling*. Ann N Y Acad Sci, 2008. 1143: p. 1-20.
 73. Kawai, T. and S. Akira, *The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition*.

- Int Immunol, 2009. 21(4): p. 317-37.
74. Kawai, T. and S. Akira, *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors*. Nat Immunol, 2010. 11(5): p. 373-84.
 75. Kawai, T. and S. Akira, *Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity*. Immunity, 2011. 34(5): p. 637-50.
 76. Kayali, Z., et al., *Hepatitis C, cryoglobulinemia, and cirrhosis: a meta-analysis*. Hepatology, 2002. 36(4 Pt 1): p. 978-85.
 77. Kimmel, P.L., et al., *Upregulation of MHC class II, interferon-alpha and interferon-gamma receptor protein expression in HIV-associated nephropathy*. Nephrol Dial Transplant, 2003. 18(2): p. 285-92.
 78. Kimmel PL, P.T., *Immune complex glomerulonephritis associated with HIV infection*. Kimmel PL, Berns JS, Stein JH, Eds. Renal and urological aspects of HIV infection, New York: Churchill Livingstone, 1995: p. 77-110.
 79. Kindt, T.J., et al., *Kuby immunology*. 6th ed. 2007, New York: W.H. Freeman. xxii, 574, A-31, G-12, AN-27, I-27 p.
 80. Kono, H. and K.L. Rock, *How dying cells alert the immune system to danger*. Nat Rev Immunol, 2008. 8(4): p. 279-89.
 81. Koopman, G., et al., *Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis*. Blood, 1994. 84(5): p. 1415-20.
 82. Kriz, W., *Fenestrated glomerular capillaries are unique*. J Am Soc Nephrol, 2008. 19(8): p. 1439-40.
 83. Krug, A., et al., *Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9*. Blood, 2004. 103(4): p. 1433-7.
 84. Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira, *Pathogen recognition in the innate immune response*. Biochem J, 2009. 420(1): p. 1-16.
 85. Lai, A.S. and K.N. Lai, *Viral nephropathy*. Nat Clin Pract Nephrol, 2006. 2(5): p. 254-62.
 86. Lai, F.M., et al., *Hepatitis B virus-related nephropathy and lupus nephritis: morphologic similarities of two clinical entities*. Mod Pathol, 2000. 13(2): p. 166-72.
 87. Lai, K.N., et al., *Detection of hepatitis B virus DNA and RNA in kidneys of HBV related glomerulonephritis*. Kidney Int, 1996. 50(6): p. 1965-77.
 88. Lau, C.M., et al., *RNA-associated autoantigens activate B cells by combined B cell antigen receptor/Toll-like receptor 7 engagement*. J Exp Med, 2005. 202(9): p. 1171-7.
 89. Lemaitre, B., et al., *The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults*. Cell, 1996. 86(6): p. 973-83.
 90. Leventhal, J.S. and M.J. Ross, *Pathogenesis of HIV-associated nephropathy*. Semin Nephrol, 2008. 28(6): p. 523-34.
 91. Levy, M. and N. Chen, *Worldwide perspective of hepatitis B-associated glomerulonephritis in the 80s*. Kidney Int Suppl, 1991. 35: p. S24-33.
 92. Ley, K. and J. Reutershan, *Leucocyte-endothelial interactions in health and disease*.

- Handb Exp Pharmacol, 2006(176 Pt 2): p. 97-133.
93. Li, X.L., et al., *A central role for RNA in the induction and biological activities of type I interferons*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2011. 2(1): p. 58-78.
 94. Livengood, A.J., C.C. Wu, and D.A. Carson, *Opposing roles of RNA receptors TLR3 and RIG-I in the inflammatory response to double-stranded RNA in a Kaposi's sarcoma cell line*. Cell Immunol, 2007. 249(2): p. 55-62.
 95. Loiarro, M., et al., *Peptide-mediated interference of TIR domain dimerization in MyD88 inhibits interleukin-1-dependent activation of NF- κ B*. J Biol Chem, 2005. 280(16): p. 15809-14.
 96. Lund, J., et al., *Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells*. J Exp Med, 2003. 198(3): p. 513-20.
 97. Maher, S.G., et al., *Interferon: cellular executioner or white knight?* Curr Med Chem, 2007. 14(12): p. 1279-89.
 98. Malathi, K., et al., *Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity*. Nature, 2007. 448(7155): p. 816-9.
 99. Marie, I., J.E. Durbin, and D.E. Levy, *Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7*. EMBO J, 1998. 17(22): p. 6660-9.
 100. Martin, S.J., et al., *Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl*. J Exp Med, 1995. 182(5): p. 1545-56.
 101. Mathieson, P.W., *Glomerulonephritis: is it worth worrying about?* Clin Med, 2005. 5(3): p. 264-6.
 102. Mathieson, P.W., *Proteinuria and immunity--an overstated relationship?* N Engl J Med, 2008. 359(23): p. 2492-4.
 103. Medzhitov, R., *Recognition of microorganisms and activation of the immune response*. Nature, 2007. 449(7164): p. 819-26.
 104. Meyers, C.M., et al., *Hepatitis C and renal disease: an update*. Am J Kidney Dis, 2003. 42(4): p. 631-57.
 105. Migliorini, A. and H.J. Anders, *A novel pathogenetic concept-antiviral immunity in lupus nephritis*. Nat Rev Nephrol, 2012. 8(3): p. 183-9.
 106. Morales, J.M., N. Kamar, and L. Rostaing, *Hepatitis C and renal disease: epidemiology, diagnosis, pathogenesis and therapy*. Contrib Nephrol, 2012. 176: p. 10-23.
 107. Munz, C., et al., *Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity?* Nat Rev Immunol, 2009. 9(4): p. 246-58.
 108. Murphy, K.P., et al., *Janeway's immunobiology*. 7th ed. 2008, New York: Garland Science. xxi, 887 p.
 109. Muruve, D.A., et al., *The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response*. Nature, 2008. 452(7183): p. 103-7.
 110. Nagano, Y. and Y. Kojima, *[Immunizing property of vaccinia virus inactivated by ultraviolet rays.]*. C R Seances Soc Biol Fil, 1954. 148(19-20): p. 1700-2.

111. NKF, *National Kidney Foundation, KDOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification, and Stratification*. http://www.kidney.org/professionals/kdoqi/guidelines_ckd/p1_exec.htm.
112. Nouredine, L.A., et al., *Hepatitis C increases the risk of progression of chronic kidney disease in patients with glomerulonephritis*. *Am J Nephrol*, 2010. 32(4): p. 311-6.
113. O'Neill, L.A. and A.G. Bowie, *The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling*. *Nat Rev Immunol*, 2007. 7(5): p. 353-64.
114. Okamoto, Y., et al., *Cholesterol oxidation switches the internalization pathway of endothelin receptor type A from caveolae to clathrin-coated pits in Chinese hamster ovary cells*. *J Biol Chem*, 2000. 275(9): p. 6439-46.
115. Patole, P.S., et al., *Viral double-stranded RNA aggravates lupus nephritis through Toll-like receptor 3 on glomerular mesangial cells and antigen-presenting cells*. *J Am Soc Nephrol*, 2005. 16(5): p. 1326-38.
116. Pawar, R.D., et al., *Bacterial lipopeptide triggers massive albuminuria in murine lupus nephritis by activating Toll-like receptor 2 at the glomerular filtration barrier*. *Immunology*, 2009. 128(1 Suppl): p. e206-21.
117. Pichlmair, A., et al., *RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates*. *Science*, 2006. 314(5801): p. 997-1001.
118. Pichlmair, A. and C. Reis e Sousa, *Innate recognition of viruses*. *Immunity*, 2007. 27(3): p. 370-83.
119. Platanias, L.C., *Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling*. *Nat Rev Immunol*, 2005. 5(5): p. 375-86.
120. Pober, J.S. and W.C. Sessa, *Evolving functions of endothelial cells in inflammation*. *Nat Rev Immunol*, 2007. 7(10): p. 803-15.
121. Poggi, A., et al., *Adhesion molecules and kinases involved in gammadelta T cells migratory pathways: implications for viral and autoimmune diseases*. *Curr Med Chem*, 2007. 14(30): p. 3166-70.
122. Prakash, A., et al., *Tissue-specific positive feedback requirements for production of type I interferon following virus infection*. *J Biol Chem*, 2005. 280(19): p. 18651-7.
123. Quaggin, S.E. and J.A. Kreidberg, *Development of the renal glomerulus: good neighbors and good fences*. *Development*, 2008. 135(4): p. 609-20.
124. QUASINiere, *Qualitätssicherung in der chronischen Nierenersatztherapie (Dialyse und Nierentransplantation)*. Bericht 2005/2006.
125. Rastaldi, M.P., et al., *Adhesion molecules expression in noncrescentic acute post-streptococcal glomerulonephritis*. *J Am Soc Nephrol*, 1996. 7(11): p. 2419-27.
126. Reichel, C.A., et al., *Chemokine receptors Ccr1, Ccr2, and Ccr5 mediate neutrophil migration to postischemic tissue*. *J Leukoc Biol*, 2006. 79(1): p. 114-22.
127. Reichel, C.A., et al., *Gelatinases mediate neutrophil recruitment in vivo: evidence for stimulus specificity and a critical role in collagen IV remodeling*. *J Leukoc Biol*, 2008. 83(4): p. 864-74.
128. Ribeiro, A., et al., *Activation of innate immune defense mechanisms contributes to polyomavirus BK-associated nephropathy*. *Kidney Int*, 2012. 81(1): p. 100-11.

129. Robert-Koch-Institut, *Epidemiologisches Bulletin Nr. 46/2005, Berlin*. 2005.
130. Robert-Koch-Institut, *Epidemiologisches Bulletin Nr. 20/2010, Berlin*. 2010.
131. Roberts, T.L., et al., *H1N-200 proteins regulate caspase activation in response to foreign cytoplasmic DNA*. Science, 2009. 323(5917): p. 1057-60.
132. Ryu, M., et al., *Plasma leakage through glomerular basement membrane ruptures triggers the proliferation of parietal epithelial cells and crescent formation in non-inflammatory glomerular injury*. J Pathol, 2012.
133. Sadler, A.J. and B.R. Williams, *Interferon-inducible antiviral effectors*. Nat Rev Immunol, 2008. 8(7): p. 559-68.
134. Saleh, M.C., et al., *The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing*. Nat Cell Biol, 2006. 8(8): p. 793-802.
135. Sansonno, D., et al., *Hepatitis C virus RNA and core protein in kidney glomerular and tubular structures isolated with laser capture microdissection*. Clin Exp Immunol, 2005. 140(3): p. 498-506.
136. Satchell, S.C. and F. Braet, *Glomerular endothelial cell fenestrations: an integral component of the glomerular filtration barrier*. Am J Physiol Renal Physiol, 2009. 296(5): p. F947-56.
137. Sato, M., et al., *Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction*. Immunity, 2000. 13(4): p. 539-48.
138. Savarese, E., et al., *U1 small nuclear ribonucleoprotein immune complexes induce type I interferon in plasmacytoid dendritic cells through TLR7*. Blood, 2006. 107(8): p. 3229-34.
139. Schindler, C., D.E. Levy, and T. Decker, *JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines*. J Biol Chem, 2007. 282(28): p. 20059-63.
140. Schlee, M., V. Hornung, and G. Hartmann, *siRNA and isRNA: two edges of one sword*. Mol Ther, 2006. 14(4): p. 463-70.
141. Seth, R.B., L. Sun, and Z.J. Chen, *Antiviral innate immunity pathways*. Cell Res, 2006. 16(2): p. 141-7.
142. Shibamiya, A., et al., *A key role for Toll-like receptor-3 in disrupting the hemostasis balance on endothelial cells*. Blood, 2009. 113(3): p. 714-22.
143. Singh, A., et al., *Glomerular endothelial glycocalyx constitutes a barrier to protein permeability*. J Am Soc Nephrol, 2007. 18(11): p. 2885-93.
144. Sorensson, J., et al., *Glomerular charge selectivity for horseradish peroxidase and albumin at low and normal ionic strengths*. Acta Physiol Scand, 1998. 163(1): p. 83-91.
145. Stetson, D.B. and R. Medzhitov, *Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response*. Immunity, 2006. 24(1): p. 93-103.
146. Stetson, D.B. and R. Medzhitov, *Type I interferons in host defense*. Immunity, 2006. 25(3): p. 373-81.
147. Strauss, J., et al., *Renal disease in children with the acquired immunodeficiency syndrome*. N Engl J Med, 1989. 321(10): p. 625-30.

148. Tabeta, K., et al., *Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(10): p. 3516-21.
149. Takaoka, A., et al., *DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response*. Nature, 2007. 448(7152): p. 501-5.
150. Takeda, K. and S. Akira, *Toll-like receptors in innate immunity*. Int Immunol, 2005. 17(1): p. 1-14.
151. Tamura, T., et al., *The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis*. Annu Rev Immunol, 2008. 26: p. 535-84.
152. Taniguchi, T., et al., *IRF family of transcription factors as regulators of host defense*. Annu Rev Immunol, 2001. 19: p. 623-55.
153. Tarantino, A., et al., *Long-term predictors of survival in essential mixed cryoglobulinemic glomerulonephritis*. Kidney Int, 1995. 47(2): p. 618-23.
154. Theofilopoulos, A.N., et al., *Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity*. Annu Rev Immunol, 2005. 23: p. 307-36.
155. Tillmann, H.L. and A. Schwarz, *[Virus associated glomerulonephritis]*. Internist (Berl), 2003. 44(9): p. 1098-106.
156. Tissari, J., et al., *IFN-alpha enhances TLR3-mediated antiviral cytokine expression in human endothelial and epithelial cells by up-regulating TLR3 expression*. J Immunol, 2005. 174(7): p. 4289-94.
157. Trullas, J.C., et al., *Renal transplantation in HIV-infected patients: 2010 update*. Kidney Int, 2011. 79(8): p. 825-42.
158. Uotila, M., E. Ruoslahti, and E. Engvall, *Two-site sandwich enzyme immunoassay with monoclonal antibodies to human alpha-fetoprotein*. J Immunol Methods, 1981. 42(1): p. 11-5.
159. USRDS, *Atlas of End-Stage Renal Disease in the United States*, National Institute of Health U.S. Renal Data System, The 2009 Annual Data Report.
160. Uze, G., et al., *The receptor of the type I interferon family*. Curr Top Microbiol Immunol, 2007. 316: p. 71-95.
161. Vaughan, M.R. and S.E. Quaggin, *How do mesangial and endothelial cells form the glomerular tuft?* J Am Soc Nephrol, 2008. 19(1): p. 24-33.
162. Vermes, I., et al., *A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V*. J Immunol Methods, 1995. 184(1): p. 39-51.
163. Vinen, C.S. and D.B. Oliveira, *Acute glomerulonephritis*. Postgrad Med J, 2003. 79(930): p. 206-13; quiz 212-3.
164. Waldman, M. and J.B. Kopp, *Parvovirus B19 and the kidney*. Clin J Am Soc Nephrol, 2007. 2 Suppl 1: p. S47-56.
165. Waldman, M., et al., *Viruses and kidney disease: beyond HIV*. Semin Nephrol, 2008. 28(6): p. 595-607.
166. Wang, Z., et al., *Regulation of innate immune responses by DAI (DLM-1/ZBP1) and other DNA-sensing molecules*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(14): p. 5477-82.

167. Welsch, U., *Lehrbuch Histologie*. Urban & Fischer, 2003. 1. Auflage.
168. WHO, *Hepatitis B*. 2002.
http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/HepatitisB_whocdscsrlyo2002_2.pdf.
169. Wornle, M., et al., *Novel role of toll-like receptor 3 in hepatitis C-associated glomerulonephritis*. Am J Pathol, 2006. 168(2): p. 370-85.
170. Wornle, M., et al., *Novel role of toll-like receptor 3, RIG-I and MDA5 in poly (I:C) RNA-induced mesothelial inflammation*. Mol Cell Biochem, 2009. 322(1-2): p. 193-206.
171. Wuthrich, R.P., *Intercellular adhesion molecules and vascular cell adhesion molecule-1 and the kidney*. J Am Soc Nephrol, 1992. 3(6): p. 1201-11.
172. Yang, A.H., et al., *The clinicopathological implications of endothelial tubuloreticular inclusions found in glomeruli having histopathology of idiopathic membranous nephropathy*. Nephrol Dial Transplant, 2009. 24(11): p. 3419-25.
173. Yasuda, K., et al., *Murine dendritic cell type I IFN production induced by human IgG-RNA immune complexes is IFN regulatory factor (IRF)5 and IRF7 dependent and is required for IL-6 production*. J Immunol, 2007. 178(11): p. 6876-85.
174. Yoneyama, M., et al., *The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses*. Nat Immunol, 2004. 5(7): p. 730-7.
175. Yoneyama, M. and T. Fujita, *Structural mechanism of RNA recognition by the RIG-I-like receptors*. Immunity, 2008. 29(2): p. 178-81.
176. Yoneyama, M. and T. Fujita, *RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors*. Immunol Rev, 2009. 227(1): p. 54-65.
177. Yoneyama, M. and T. Fujita, *Recognition of viral nucleic acids in innate immunity*. Rev Med Virol, 2010. 20(1): p. 4-22.
178. Zhang, S.Y., et al., *TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis*. Science, 2007. 317(5844): p. 1522-7.
179. Zlotnik, A., O. Yoshie, and H. Nomiyama, *The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution*. Genome Biol, 2006. 7(12): p. 243.

Abkürzungsverzeichnis

7 Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin converting enzyme
AIM	Absent in melanoma
ANCA	Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper
ANOVA	Analysis of variance
APC	Antigenpräsentierende Zelle (antigen presenting cell)
BKV	Polyoma-Virus 1 (BK-Virus)
BSA	Bovines Serumalbumin (Rinderserumalbumin)
CARD	Caspase recruitment domain
Cardif	CARD adapter inducing Interferon β
CCL2	CC-Motiv-Chemokin-Ligand 2
CCL5	CC-Motiv-Chemokin-Ligand 5
CD	Cluster of Differentiation
CDK	Zyclin-abhängige Kinase (cyclin dependent kinase)
cDNA	Komplementäre DNA (complementary DNA)
CH ₃ COONa	Natriumacetat
CL	Kationisches Lipid (cationic lipid)
CMV	Zytomegalievirus
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
CXCL10	CXC-Motiv-Chemokin-Ligand 10
DAI	DNA-dependent activator of IRF
DC	Dendritische Zelle
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
dsDNA	Doppelsträngige DNA (double stranded DNA)
dsRNA	Doppelsträngige RNA (double stranded RNA)
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay

EMCV	Enzephalomyokarditisvirus
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FBS	Fetales Rinderserum (fetal bovine serum)
Fc	Fragment crystallizable
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	Vorwärtslichtstreuung (Forward Scatter)
FSGS	Fokal segmentale Glomerulosklerose
g	Gramm
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GN	Glomerulonephritis
h	Stunde
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCl	Hydrogenchlorid
HCV	Hepatitis-C-Virus
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HIVAN	HIV-assoziierte Nephropathie
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
HSV	Herpes-simplex-Virus
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon- α/β -Rezeptor
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IKK ϵ/i	I κ B Kinase ϵ/i
IL	Interleukin
IP-10	Interferon-inducible protein 10
IPS	Interferon β promoter stimulator
IRAK	IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase
IRF	Interferon-regulierender Faktor
ISG	Interferon-stimuliertes Gen
ISGF	Interferon-stimulated genes factor

ISRE	Interferon-stimulated response element
JAK	Janus-Kinase
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
l	Liter
LDL	Low Density Lipoprotein
LGP2	Laboratory of genetics and physiology
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin-reiche Wiederholung (leucin-rich-repeat)
LSB	Low salt buffer
m	Meter
M	Stoffmengenkonzentration in Mol / Liter
MAP	Mitogen-activated protein
MAVS	Mitochondrial anti-viral signaling
MCD	Minimal-change disease
MCP-1	Monocyte chemo-attractant protein 1
MDA	Melanoma differentiation associated gene
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	Major Histocompatibility Complex
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MPGN	Membranoproliferative Glomerulonephritis
mRNA	Messenger RNA
MX1	Myxovirus resistance 1 GTPase
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
Na ₂ HPO ₄	di-Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NALP	NACHT-, LRR- and PYD-containing protein
NFκB	Nuclear factor κB
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NLR	Nod-like Rezeptor
NLRP	NLR family, pyrin domain containing protein

NO	Stickstoffmonoxid
NOD	Nucleotide-binding oligomerization domain
OAS	2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase
OD	Optische Dichte
PAMP	Pathogen-assoziierte Strukturmoleküle (Pathogen-associated-molecular-pattern)
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
pDC	Plasmozytische DC (plasmacytoid dendritic cell)
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
PG	Prostaglandin
PI	Propidiumiodid
PIAS	Protein inhibitors of activated STAT
P-IRF	Phosphoryl-IRF
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Poly dA/dT-DNA	Poly(Desoxy-Adenosin-Thymidyl)-Säure
Poly I:C-RNA	Poly-Inosin : Poly-Cytidyl-Säure
PPP	Tri-Phosphat
PRR	Pathogenerkennungsrezeptor (pattern recognition receptor)
PS	Penicillin-Streptomycin
PYD	N-terminale Pyrin Domäne
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted
RICK	Rip-like interactive clarp kinase
RIG	Retinoid acid inducible gene
RISC	RNA-induced silencing complex
RLH	RIG-like Helicase
RLR	RIG-like Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNase	Ribonuclease
RPGN	Rapid-progressive Glomerulonephritis
RPMI-1640	Zellkulturmedium, entwickelt von <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rRNA	Ribosomale RNA

RSV	Respiratorisches Synzytialvirus (respiratory syncytial virus)
RT-PCR	Reverse-Transkriptase PCR
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natrium-Dodecylsulfat)
SEM	Standard error of the mean
siRNA	Short interfering RNA
SOCS	Suppressors of cytokine signaling
SSC	Seitwärtslichtstreuung (Side Scatter)
ssRNA	Einzelsträngige RNA (single stranded RNA)
STAT	Signal transducers and activators of transcription
Taq-Polymerase	DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>
TBK	Tank-binding kinase
TBS	Tris buffered saline
TBST	Tris buffered saline Tween-20
T _C -Zelle	Zytotoxische Zelle (cytotoxic T cell)
TGF- β	Transforming growth factor β
T _H -Zelle	T-Helferzelle
TIR	Toll-interleukin-1 receptor
TIRAP	TIR-containing adaptor protein
TLR	Toll-like Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
TRIF	TIR containing adaptor-inducing Interferon β
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit (unit)
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VISA	Virus induced signaling adapter
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World-Health Organisation)
WNV	West-Nile-Virus
x g	Vielfaches der Schwerebeschleunigung (auf der Erde 9,8 ms ⁻²)
ZBP	Z-DNA-binding protein

Lebenslauf und Danksagung

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Holger Hägele
Geboren am	18.08.1986 in Augsburg
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

09/1992 – 07/1996	Grundschule am Eichenwald, Neusäß
09/1996 – 07/2005	Justus-von-Liebig Gymnasium, Neusäß
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

10/2005 – 04/2012	Studium der Humanmedizin an der LMU München
08/2007	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2012	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Promotion

04/2008 – 11/2009	Promotion bei Herrn Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders, Nephrologisches Zentrum der Medizinischen Poliklinik Innenstadt, LMU München Thema: <i>Molekulare Mechanismen viral-getriggelter Glomerulonephritis: Aktivierung glomerulärer Endothelzellen über MyD88-unabhängige zytosolische RNA- und DNA-Erkennung</i>
-------------------	--

Förderung

04/2008 – 09/2009	Förderung der Promotion durch das Promotionsstudium „Systembiologische Medizin“ im Rahmen des „Förderprogramms für Forschung und Lehre“ (FöFoLe) der LMU München
-------------------	--

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Allam R, Scherbaum CR, Darisipudi MN, Mulay SR, **Hägele H**, Lichtnekert J, Hagemann JH, Rupanagudi KV, Ryu M, Schwarzenberger C, Hohenstein B, Hugo C, Uhl B, Reichel CA, Krombach F, Monestier M, Liapis H, Moreth K, Schaefer L, Anders HJ. Histones from dying renal cells aggravate acute kidney injury via TLR2 and 4. *J Am Soc Nephrol*. 2012 Aug;23(8):1375-88. doi: 10.1681/ASN.2011111077. Epub 2012 Jun 7.

Hägele H, Allam R, Pawar RD, Reichel CA, Krombach F, Anders HJ. Double-stranded DNA activates glomerular endothelial cells and enhances albumin permeability via a toll-like receptor-independent cytosolic DNA recognition pathway. *Am J Pathol*. 2009 Nov;175(5):1896-904.

Hägele H, Allam R, Pawar RD, Anders HJ. Double-stranded RNA activates type I interferon secretion in glomerular endothelial cells via retinoic acid-inducible gene (RIG)-1. *Nephrol Dial Transplant*. 2009 Nov;24(11):3312-8.

Sayyed SG*, **Hägele H***, Kulkarni OP, Endlich K, Segerer S, Eulberg D, Klussmann S, Anders HJ. Podocytes produce homeostatic chemokine stromal cell-derived-factor-1/CXCL12, which contributes to glomerulosclerosis, podocyte loss and albuminuria in a mouse model of type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2009 Nov;52(11):2445-54. *geteilte Erstautorenschaft

Vorträge

Hägele H., et. al., Aktivierung glomerulärer Endothelzellen durch Nukleinsäuren – ein Beitrag zur viral induzierten Glomerulonephritis?, Kongress für Nephrologie 2009 der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, 28. September 2009, Göttingen

Hägele H., et. al., Molekulare Mechanismen der nukleinsäureinduzierten Immunantwort bei glomerulären Endothelzellen, Junge Niere, 20. Juni 2009, München

Posterpräsentationen

Hägele H, Allam R, Pawar RD, Reichel CA, Krombach F, Anders HJ Viral double-stranded RNA and B-DNA activate glomerular endothelial cells via MyD88-independent cytosolic RNA and DNA recognition pathways, American Society of Nephrology (ASN) Renal Week, 27. Oktober – 01. November 2009, San Diego, USA

Hägele H, Allam R, Gaikwad AB, Pawar RD, Anders HJ. Virale doppelsträngige RNA und B-DNA aktivieren glomeruläre Endothelzellen über MyD88-unabhängige zytosolische RNA- und DNA-Erkennung, 115. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin e.V. (DGIM), 21. April 2009, Wiesbaden

Hägele H, Allam R, Pawar RD, Reichel CA, Krombach F, Anders HJ. Virale doppelsträngige RNA und DNA aktivieren glomeruläre Endothelzellen – ein Beitrag zur viral-induzierten Glomerulonephritis?, Doktorarbeitstage Medizin (DoktaMed) 11. Mai 2010, München

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders, der mich jederzeit mit größtem Einsatz betreute und unterstützte. Ihm verdanke ich die Möglichkeit, mich wissenschaftlich mit einer sehr interessanten Thematik auseinander zu setzen und neben der klinisch-ärztlichen Verantwortung auch tiefergehende Einblicke in die experimentelle Forschung zu erhalten. Vielen Dank für diese Erfahrung, die mich auf meinem zukünftigen ärztlichen Weg fest begleiten wird.

Herrn Prof. Dr. Reincke und Herrn Prof. Dr. Dr. Heesemann möchte ich für die Organisation und Aufnahme in das Förderprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe) der LMU danken.

Herzlich danke ich Ewa Radomska, Stephanie Pfeiffer, Allam Ramanjaneyulu, Rahul Pawar, Liliana Castrezana Lopez, Sebastian Clauss, Katharina Flür, Peter Kurktschiev, Anil Gaikwad und Onkar Kulkarni, die mich vorbildlich und geduldig einarbeiteten und mir in methodischen Fragen hilfsbereit mit bestem Rat zur Seite standen. Ferner danke ich allen weiteren Kollegen der Arbeitsgruppe, Maciej Lech, Alejandro Avila Ferrufino, Heni Eka Susanti, und Sufyan Sayyed, für die angenehme Zusammenarbeit.

Frau Dr. Neşe Akış danke ich für die Isolation und Bereitstellung der murinen glomerulären Endothelzellen (GEnC).

Herrn Prof. Dr. med. vet. Dr. med habil. Fritz Krombach und Herrn Dr. med. Christoph Reichel sei außerordentlich für deren professionelle Durchführung der intravitalmikroskopischen Endothelstudien im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin gedankt.

Herzlichster Dank gilt all meinen Freunden für die große Unterstützung in schwierigeren Phasen und die tolle Zeit in angenehmen Lebenslagen. Danke an Andi, Justin und Philipp.

Meinen Eltern gebührt größte Dankbarkeit dafür, mir auf meinem Lebensweg unermüdlich geholfen und mir diesen ermöglicht zu haben. Meinem verstorbenen Vater Rudolf, der mich bis zu seinem Tode stets intelligent, humorvoll und gutherzig begleitete und mir den richtigen Weg wies, und meiner Mutter Behnan, die mich nicht nur während der Anfertigung dieser Dissertation jederzeit aufmunterte, motivierte und großartig unterstützte.